

PATENT
Attorney Docket No.: 58777.000012

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Application of:)
)
Fumiyuki HATTORI et al.) Group Art Unit: To Be Assigned
)
Application Number: 10/642,272) Examiner: To Be Assigned
)
Filed: August 18, 2003)
)
For: THERAPEUTIC METHODS AND AGENTS FOR DISEASES ASSOCIATED WITH
DECREASED EXPRESSION OF AOP-1 GENE OR AOP-1

TRANSMITTAL LETTER

Mail Stop Patent Application
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, Virginia 22313-1450

Sir:

The following are enclosed for consideration in the above-identified application:

		FEE
<input type="checkbox"/>	Response to Notice to File Missing Parts accompanied by a copy of the original Notice	\$
<input type="checkbox"/>	Statutory basic filing fee	\$
<input type="checkbox"/>	Declaration: <input type="checkbox"/> Original; <input type="checkbox"/> Supplemental <input type="checkbox"/> Surcharge Only	\$
<input type="checkbox"/>	Submission of Sequence Listing and computer readable form of the same	\$
<input type="checkbox"/>	Substitute Drawings: <input type="checkbox"/> Sheets (Figs.)	\$
<input type="checkbox"/>	Information Disclosure Statement, Form PTO-1449, copy of French and International Search Reports, and 6 references <input type="checkbox"/>	\$
<input type="checkbox"/>	Amendment: <input type="checkbox"/> Preliminary; <input type="checkbox"/> § 116; <input type="checkbox"/> § 312; <input type="checkbox"/> Other	\$
<input type="checkbox"/>	Request for Extension of Time (.....)	\$
<input type="checkbox"/>	Issue Fee: <input type="checkbox"/> Part B - Issue Fee Transmittal <input type="checkbox"/> Part C - Charge to Deposit Account	\$
<input type="checkbox"/>	Notice of Appeal	\$
<input type="checkbox"/>	Assignment along with PTO-1595 (separate check)	\$
<input type="checkbox"/>	Request for Corrected Official Filing Receipt along with a copy of the original filing receipt indicating changes in red	\$
<input type="checkbox"/>	Reply Brief	\$
<input checked="" type="checkbox"/>	Submission of Priority Document: Japanese Patent Application No. 41003/2001, filed on February 16, 2001	\$
<input type="checkbox"/>	Other: Change of Address For Future Correspondence	\$
<input type="checkbox"/>	An additional claim fee is required, and is calculated as shown below	\$
TOTAL FEES BEING SUBMITTED		\$

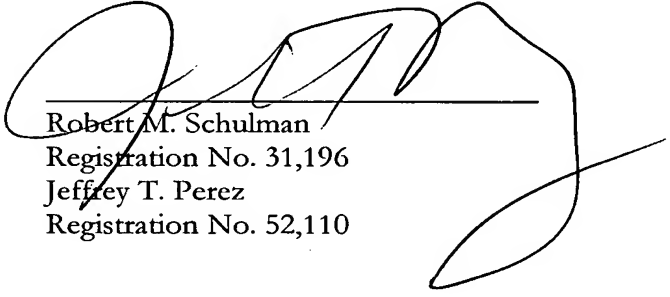
	Claims Remaining	Claims Paid For	Extra	Rate	Fee
Total Claims		20		x \$18.00	\$
Independent Claims		3		x \$86.00	\$
Multiple Dependent Claims (if applicable)				\$290.00	\$
TOTAL EXCESS CLAIMS FEE					\$
SMALL ENTITY TOTAL (if applicable)					\$

The Commissioner is hereby authorized to charge payment of any additional filing fees required under 37 CFR § 1.16 and § 1.17 associated with this communication or credit any overpayment to the deposit account of Hunton & Williams, Deposit Account Number 50-0206.

Respectfully submitted,

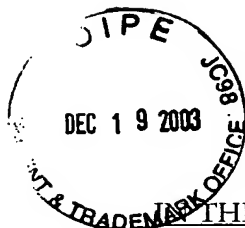
Date: 19 December 2003

By:


Robert M. Schulman
Registration No. 31,196
Jeffrey T. Perez
Registration No. 52,110

HUNTON & WILLIAMS LLP
Intellectual Property Department
1900 K Street, N.W., Suite 1200
Washington, DC 20006-1109
(202) 955-1500 (telephone)
(202) 778-2201 (facsimile)

RMS/JTP/cbt



THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Application of:)
)
Fumiyuki HATTORI et al.) Group Art Unit: To Be Assigned
)
Application Number: 10/642,272) Examiner: To Be Assigned
)
Filed: August 18, 2003)
)
For: THERAPEUTIC METHODS AND AGENTS FOR DISEASES ASSOCIATED WITH
DECREASED EXPRESSION OF AOP-1 GENE OR AOP-1

SUBMISSION OF PRIORITY DOCUMENT

Mail Stop Patent Application
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, Virginia 22313-1450

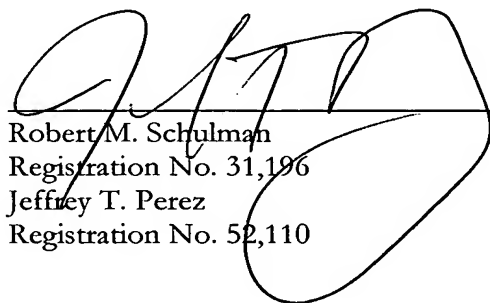
Sir:

Applicant is enclosing a certified copy of Japanese Patent Application No. 41003/2001, filed in Japan on February 16, 2001. This document provides a basis for Applicant's claim for priority.

No fee is believed due as a result of this submission. However, if a fee is due upon the filing of this priority document, please charge the undersigned's Deposit Account No. 50-0206.

Respectfully submitted,

Date: 19 December 2003

By: 
Robert M. Schulman
Registration No. 31,196
Jeffrey T. Perez
Registration No. 52,110

HUNTON & WILLIAMS LLP
Intellectual Property Department
1900 K Street, N.W., Suite 1200
Washington, DC 20006-1109
(202) 955-1500 (telephone)
(202) 778-2201 (facsimile)

RMS/JTP/cbt

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 1 年 2 月 1 6 日
Date of Application:

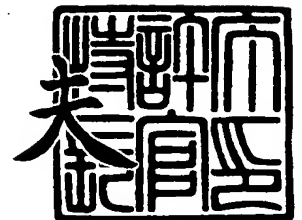
出 願 番 号 特 願 2 0 0 1 - 0 4 1 0 0 3
Application Number:
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 1 - 0 4 1 0 0 3]

出 願 人 サントリー株式会社
Applicant(s): 株式会社第一サントリー生物医学研究所

2 0 0 3 年 1 2 月 1 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康



【書類名】 特許願

【整理番号】 010361

【提出日】 平成13年 2月16日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 A61K

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府三島郡島本町若山台1丁目1番1号 株式会社サ
ントリー生物医学研究所内

【氏名】 服部 文幸

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府三島郡島本町若山台1丁目1番1号 株式会社サ
ントリー生物医学研究所内

【氏名】 杉村 恵二郎

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府三島郡島本町若山台1丁目1番1号 株式会社サ
ントリー生物医学研究所内

【氏名】 古谷 真優美

【特許出願人】

【識別番号】 000001904

【氏名又は名称】 サントリー株式会社

【特許出願人】

【識別番号】 500422182

【氏名又は名称】 株式会社サントリー生物医学研究所

【代理人】**【識別番号】** 100089705**【住所又は居所】** 東京都千代田区大手町二丁目 2 番 1 号 新大手町ビル 2
0 6 区 ユアサハラ法律特許事務所**【弁理士】****【氏名又は名称】** 社本 一夫**【電話番号】** 03-3270-6641**【選任した代理人】****【識別番号】** 100071124**【弁理士】****【氏名又は名称】** 今井 庄亮**【選任した代理人】****【識別番号】** 100076691**【弁理士】****【氏名又は名称】** 増井 忠武**【選任した代理人】****【識別番号】** 100075270**【弁理士】****【氏名又は名称】** 小林 泰**【選任した代理人】****【識別番号】** 100096013**【弁理士】****【氏名又は名称】** 富田 博行**【選任した代理人】****【識別番号】** 100091638**【弁理士】****【氏名又は名称】** 江尻 ひろ子

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 051806

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9706781

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 AOP-1遺伝子又はAOP-1の発現減少を伴う疾患の治療方法及び当該疾患治療薬

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 AOP-1遺伝子又はAOP-1の発現減少を伴う疾患の予防又は治療方法において、（１）AOP-1をコードする核酸、若しくはAOP-1のアミノ酸配列中のアミノ酸が１つ以上付加、欠失、置換されたAOP-1の機能を有するポリペプチドをコードする核酸を導入すること、又は（２）AOP-1遺伝子の発現を増強する物質、AOP-1の産生を増強する物質若しくはAOP-1の機能を増強する物質を投与すること、からなる当該予防又は治療方法。

【請求項 2】 AOP-1をコードする核酸又はAOP-1のアミノ酸配列中のアミノ酸が１つ以上付加、欠失、置換されたAOP-1の機能を有するポリペプチドをコードする核酸を患部組織の細胞に導入することからなる請求項 1 記載の予防又は治療方法。

【請求項 3】 AOP-1遺伝子の発現を増強する物質を投与することからなる請求項 1 記載の予防又は治療方法。

【請求項 4】 AOP-1の産生を増強する物質を投与することからなる請求項 1 記載の予防又は治療方法。

【請求項 5】 AOP-1の産生を増強する作用を有する物質が、AOP-1をコードする核酸又はAOP-1のアミノ酸配列中のアミノ酸が１つ以上付加、欠失、置換されたAOP-1の機能を有するポリペプチドをコードする核酸である請求項 4 記載の予防又は治療方法。

【請求項 6】 AOP-1の機能を増強する物質を投与することからなる請求項 1 記載の予防又は治療方法。

【請求項 7】 AOP-1遺伝子又はAOP-1の発現減少を伴う疾患が、慢性心不全、慢性関節リウマチ、神経変性疾患又は腎不全である請求項 1 乃至 6 記載の予防又は治療方法。

【請求項 8】 （１）AOP-1をコードする核酸若しくはAOP-1のアミノ酸配列中のアミノ酸が１つ以上付加、欠失、置換されたAOP-1の機能を有するポリペ

チドをコードする核酸、又は（２）AOP-1遺伝子の発現を増強する物質、AOP-1の産生を増強する物質若しくはAOP-1の機能を増強する物質、を有効成分として含有するAOP-1遺伝子又はAOP-1の発現減少を伴う疾患の予防薬又は治療薬。

【請求項 9】 AOP-1をコードする核酸又はAOP-1のアミノ酸配列中のアミノ酸が1つ以上付加、欠失、置換されたAOP-1の機能を有するポリペプチドをコードする核酸を有効成分として含有する請求項 8 記載の予防薬又は治療薬。

【請求項 1 0】 AOP-1遺伝子の発現を増強する物質を有効成分として含有する請求項 8 記載の予防薬又は治療薬。

【請求項 1 1】 AOP-1の産生を増強する物質を有効成分として含有する請求項 8 記載の予防薬又は治療薬。

【請求項 1 2】 AOP-1の産生を増強する作用を有する物質が、AOP-1をコードする核酸又はAOP-1のアミノ酸配列中のアミノ酸が1つ以上付加、欠失、置換されたAOP-1の機能を有するポリペプチドをコードする核酸である請求項 1 1 記載の予防薬又は治療薬。

【請求項 1 3】 AOP-1の機能を増強する物質を有効成分として含有する請求項 8 記載の予防薬又は治療薬。

【請求項 1 4】 AOP-1遺伝子又はAOP-1の発現減少を伴う疾患が、慢性心不全、慢性関節リウマチ、神経変性疾患又は腎不全である請求項 8 乃至 1 3 記載の予防薬又は治療薬。

【請求項 1 5】 AOP-1遺伝子の発現量又はAOP-1の産生量を測定し、当該発現量又は産生量を指標として診断することからなるAOP-1遺伝子又はAOP-1の発現減少を伴う疾患の診断方法。

【請求項 1 6】 AOP-1遺伝子又はAOP-1の発現減少を伴う疾患が、慢性心不全、慢性関節リウマチ、神経変性疾患又は腎不全である請求項 1 5 記載の診断方法。

【請求項 1 7】 AOP-1遺伝子の発現量又はAOP-1の産生量を指標として測定する手段を含むAOP-1遺伝子又はAOP-1の発現減少を伴う疾患の診断剤又は診断キット。

【請求項 1 8】 AOP-1遺伝子又はAOP-1の発現減少を伴う疾患が、慢性心不

全、慢性関節リウマチ、神経変性疾患又は腎不全である請求項 1 7 記載の診断剤又は診断キット。

【請求項 1 9】 AOP-1の産生を抑制、AOP-1遺伝子の発現を抑制又はAOP-1遺伝子を欠失することによりAOP-1遺伝子又はAOP-1の発現減少を伴う疾患の疾患モデルとして使用できる非ヒト形質転換動物。

【請求項 2 0】 AOP-1遺伝子又はAOP-1の発現減少を伴う疾患が、慢性心不全、慢性関節リウマチ、神経変性疾患又は腎不全である請求項 1 9 記載の非ヒト形質転換動物。

【請求項 2 1】 AOP-1の産生を抑制、AOP-1遺伝子を発現抑制又はAOP-1遺伝子を欠失することによりAOP-1遺伝子又はAOP-1の発現減少を伴う疾患の組織モデル又は細胞モデルとして使用できる形質転換組織又は形質転換細胞。

【請求項 2 2】 AOP-1遺伝子又はAOP-1の発現減少を伴う疾患が、慢性心不全、慢性関節リウマチ、神経変性疾患又は腎不全である請求項 2 0 記載の形質転換組織又は形質転換細胞。

【請求項 2 3】 請求項 1 8 乃至 2 1 記載の非ヒト形質転換動物、形質転換組織又は形質転換細胞に、合成若しくは遺伝子組換え技術により得られた物質、天然由来の物質又はそれらの誘導体である物質を投与又は添加し、AOP-1遺伝子の発現量またはAOP-1の産生量を検出することを含む、AOP-1遺伝子の発現を増強する物質、AOP-1の産生を増強する物質及びAOP-1の機能を増強する物質からなる群から選ばれる少なくとも 1 つをスクリーニングする方法。

【請求項 2 4】 合成若しくは遺伝子組換え技術により得られた物質、天然由来の物質又はそれらの誘導体である物質を、（１）AOP-1遺伝子の転写制御領域及びAOP-1遺伝子若しくはレポーター遺伝子を有する形質転換細胞又は試験管内発現系と接触させ、AOP-1遺伝子又はレポーター遺伝子の発現量を検出すること、又は（２）AOP-1又はAOP-1の標的分子と接触させ、AOP-1又はAOP-1の標的分子の量を検出すること、を含むAOP-1遺伝子の発現を増強する物質、AOP-1の産生を増強する物質及びAOP-1の機能を増強する物質からなる群から選ばれる少なくとも 1 つをスクリーニングする方法。

【請求項 2 5】 AOP-1遺伝子の転写制御領域をレポーター遺伝子の翻訳領

域の上流又は下流に連結した発現ベクターを構築後、適当な宿主細胞に導入して培養し、当該培養細胞に合成若しくは遺伝子組換え技術により得られた物質、天然由来の物質又はそれらの誘導体である物質を添加し、一定時間後にレポーター遺伝子の発現量又はレポータータンパク質の産生量の変化を検出することを含む請求項 24 記載のスクリーニング方法。

【請求項 26】 合成若しくは遺伝子組換え技術により得られた物質、天然由来の物質又はそれらの誘導体である物質を AOP-1 又は AOP-1 の標的分子と接触させ、当該物質と結合した又は結合しなかった AOP-1 又は AOP-1 の標的分子の量を検出することを含む請求項 24 記載のスクリーニング方法。

【請求項 27】 AOP-1 又は AOP-1 の標的分子を支持体に固定化し、当該固定化した AOP-1 又は AOP-1 の標的分子に、合成若しくは遺伝子組換え技術により得られた物質、天然由来の物質又はそれらの誘導体である物質と AOP-1 又は AOP-1 の標的分子を添加し、結合した又は結合しなかった AOP-1 又は AOP-1 の標的分子の量を検出することを含む請求項 24 記載のスクリーニング方法。

【請求項 28】 合成若しくは遺伝子組換え技術により得られた物質、天然由来の物質又はそれらの誘導体である物質を支持体に固定化し、当該固定化した物質に AOP-1 又は AOP-1 の標的分子を添加し、結合した又は結合しなかった AOP-1 又は AOP-1 の標的分子の量を検出することを含む請求項 24 記載のスクリーニング方法。

【請求項 29】 合成若しくは遺伝子組換え技術により得られた物質、天然由来の物質又はそれらの誘導体である物質を、AOP-1 又は AOP-1 の標的分子と接触させ、AOP-1 の抗酸化又は過酸化亜硝酸消去機能を測定することを含む AOP-1 の機能を増強する物質のスクリーニング方法。

【請求項 30】 AOP-1 又は AOP-1 の標的分子に、合成若しくは遺伝子組換え技術により得られた物質、天然由来の物質又はそれらの誘導体である物質と AOP-1 又は AOP-1 の標的分子を添加し、AOP-1 の抗酸化又は過酸化亜硝酸消去能を測定することを含む請求項 29 記載のスクリーニング方法。

【請求項 31】 AOP-1 又は AOP-1 の標的分子を支持体に固定化し、当該固定化した AOP-1 又は AOP-1 の標的分子に、合成若しくは遺伝子組換え技術により得ら

れた物質、天然由来の物質又はそれらの誘導体である物質とAOP-1又はAOP-1の標的分子を添加し、AOP-1の抗酸化又は過酸化亜硝酸消去機能を測定することを含む請求項29記載のスクリーニング方法。

【請求項32】 合成若しくは遺伝子組換え技術により得られた物質、天然由来の物質又はそれらの誘導体である物質を支持体に固定化し、当該固定化した物質にAOP-1又はAOP-1の標的分子を添加し、AOP-1の抗酸化又は過酸化亜硝酸消去機能を測定することを含む請求項29記載のスクリーニング方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、本発明は、疾患の予防方法、治療方法又は診断方法、疾患の予防薬又は治療薬、製剤の有効成分に係る物質のスクリーニング方法、非ヒト形質転換動物、及び形質転換組織等に関する。

【0002】

【従来の技術】

多くの重篤疾患においては、病態の進展に伴い、組織中における細胞機能低下さらには細胞死が起こることはよく知られており、この細胞脱落により、疾患の治療はより困難となり、予後の不良、再発を招くこととなる。特に心臓をはじめ、脳、腎臓等、自己再生不能臓器における疾患治療には細胞の壊死脱落を抑制することが重要な治療方針である。

(1) 慢性心不全は、心筋収縮力の低下により心臓が各臓器へ十分量の血液を拍出できない状態と定義される。心不全に至る前段階として、心臓は全身の血行を正常に保つ目的で代償的リモデリングを行う。この時期には、心筋細胞が持続的に肥大伸展化し、心拍出圧を高く保つと同時に心拍出量を維持するが、同時に心組織内の線維化が進行し、収縮細胞に対する負荷が増加する。心筋細胞に対する負荷と、肥大化による代償とのバランスが限界を迎えた時、心機能が破綻し心不全となる。心不全状態の心筋細胞では、収縮力が低下することが知られている(Am J Physiol 1997 Jul;273(1 Pt 2):H183-91)。これまでの慢性心不全治療では心不全状態つまり患者が正常な日常生活に支障をきたした時点から、心筋収縮力

を増加させるジギタリス製剤やキサンチン製剤等の強心剤が使用された。しかし、これらの薬剤は心筋エネルギーの過剰消費により、長期投与においては細胞死を促進させ、生存率を悪化させることが明らかにされた。最近では、代償期で亢進している交感神経系やレニンアンジオテンシン系による心臓への過剰な負荷を軽減させる β 遮断剤やACE阻害剤による治療が主流になってきている。しかし、心筋細胞の肥大化の防止を作用メカニズムに持つこれらの薬剤は、すでに心不全状態に陥った患者の治療には有効とは言えず、慢性心不全の予防剂的側面が強い。また、これら薬剤の発売後も依然として慢性心不全患者の長期生存率が改善されない事実は、これら薬剤の作用メカニズムの限界を示唆している。よって、代償期破綻後、慢性心不全期におけるQuality of life、生存率両面の改善をもたらす、新たな慢性心不全治療薬の開発が急務である。代償期から不全期への移行に伴い起こる破綻機構の本質的原因である、細胞死、細胞機能低下を治療する新たな治療薬の開発が望まれる。

(2) 神経変性疾患は、神経細胞の変性を特徴とする一群の疾患であり、具体的には脳梗塞、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン舞踏病、脳血管性痴呆、ピンスワンガー病等の白質傷害等が挙げられる。中でも、脳梗塞、脳血管性痴呆では、脳血流の不足による神経細胞死が発生する。アルツハイマー病では、脳内における不溶性 β アミロイド、タウ蛋白質の生成沈着による老人斑、神経原線維変化の生成が特徴的であり、これに伴う神経細胞死が認められるが、その病因は多岐にわたると考えられ、未だに十分には解明されてはいない。脳梗塞、脳血管性痴呆、アルツハイマーで共通する現象として、神経伝達物質として機能しているグルタミン酸の過剰な細胞外分泌がある(Eur J Neurosci 2000 Aug;12(8): 2735-45, Brain Res 1994 Apr 11;642(1-2):117-22)。この過剰なグルタミン酸は神経細胞表面のGlutamate receptor (NMDA受容体)を刺激し、神経の過剰興奮を誘導する。この過剰な神経興奮により細胞内イオン環境の破綻が誘導され、細胞死が起こるとする説が有力である。現在脳梗塞治療剤としては、抗血小板薬、血栓溶解剤が用いられているが、血流の再開、維持を目的としたものであり、神経細胞自体に対する保護作用を有する治療方法は未だ確立されていない。試験段階の治療薬として、NMDA受容体拮抗薬、グルタミン酸放出抑制剤、活性

酸素消去剤が開発中であるが、有効性の確認は未だされていない。アルツハイマー病の治療に関しては、最近コリンエステラーゼ阻害剤が唯一治療剤として認められたが、細胞間情報伝達を増強することによる学習機能改善がメカニズムであり、神経細胞死を直接抑制するものではない。一連の神経変性疾患に対する有効な治療方法として、神経細胞保護を作用機序とする治療薬の開発が望まれている。

(3) 慢性関節リウマチは、関節滑膜の連続的増殖を特徴とする慢性的関節炎であり、その原因は自己免疫作用に基づくと言われる。老化、遺伝的素因に加え、生活環境的因子が複合的に危険因子を形成し、感染症を初めとする何らかの関節炎症を発端として、自己抗原に対する免疫感作が生じると考えられている。進行した慢性関節リウマチでは、軟骨破壊、骨破壊と同時に、軟骨芽細胞死、骨芽細胞死が報告されている (Arthritis Rheum 1999 Jul;42(7):1528-37, Z Rheumatol 2000;59 Suppl 1:10-20)。軟骨芽細胞、骨芽細胞の死によって疾患は不可逆的な段階に入るものと考えられる。現在は、ステロイド、非ステロイド製剤による、免疫抑制作用を基とする治療が行われるが、その治療効果は持続的でなく、根治的でない。そこで、関節、骨芽細胞、軟骨芽細胞保護をメカニズムとする新しい治療剤の開発が望まれている。

(4) 慢性腎不全は、腎臓内の糸球体、尿細管の傷害を特徴とする疾患であり、具体的には、糖尿病性腎症、高血圧性腎症、ループス腎症等が挙げられる。血液中の老廃物をろ過する機能を有する糸球体と、尿からの再吸収をその機能とする尿細管における機能異常が発生する原因として、高血糖による糖化蛋白による細胞傷害、高血圧による血行不良による細胞傷害、自己免疫性の慢性腎炎が挙げられる。現在慢性腎不全に対する有効な治療方法は見出されておらず、ループス腎炎を初めとする炎症を主体とする場合にはステロイド系、非ステロイド系抗炎症剤が、高血圧性腎不全の場合は降圧剤が対処療法として適用される。現在、糸球体構成細胞、尿細管構成細胞に直接作用し保護する薬剤が望まれている。

【0003】

一方、AOP-1遺伝子は、マウス赤白血病細胞をDMSOにより分化誘導させた場合に発現量が増加する因子として同定された (Gene 80, 337-343, 1989: 当初の呼

称はMER-5であったが、後にAOP-1と改名された)。その後AOP-1タンパク質はperoxiredoxinファミリーに属することが判明し、Peroxiredoxin 3(PRx3)と文献記述されることが一般化した(以下、本明細書ではAOP-1タンパク質をAOP-1と記載する)。Peroxiredoxin familyは、精製蛋白質を用いた生化学的解析より、thiol基特異的な抗酸化活性を有する(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 91, pp. 7017-7021, July 1994)ことを特徴とする一群の蛋白質であり、原核生物からヒトを含む高等生物に広く保存されている。また、最近bacteria peroxiredoxinを用いた解析から、peroxiredoxinには過酸化亜硝酸(peroxynitrite)を除去する能力があることが見出された(Nature vol.407, 14, 2000 p211)。Peroxiredoxin familyの中でもAOP-1はミトコンドリアに局在することで、他のperoxiredoxinとは差別化されており(Methods in enzymology, vol. 300)、抗酸化蛋白として広く知られるsuperoxide dismutase (SOD)やcatalaseが、抗酸化活性発現にthiol基を要求しないことや、過酸化亜硝酸を除去できないこと等から、peroxiredoxin familyはSOD, catalaseとは生理機能面でも異なることが予見される。最近細胞質に存在するperoxiredoxin 1型及び、2型の生理機能として、培養甲状腺細胞における過酸化水素傷害に対する保護作用が見出されたが(J. Biological Chemistry Vol.275, No.24, p18266-18270, 2000)、ミトコンドリアに局在するAOP-1(peroxiredoxin 3型)の生理機能は見出されていない。また、AOP-1を含むperoxiredoxin familyは、未だにいかなる疾患との直接的関連性も示されていない。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、AOP-1遺伝子又はAOP-1の発現減少を伴う疾患(例えば、慢性心不全、慢性関節リウマチ、神経変性疾患、腎不全等)の予防方法、治療方法又は診断方法、当該疾患の予防薬又は治療薬、当該製剤の有効成分に係る物質のスクリーニング方法、AOP-1遺伝子を発現抑制又は欠失する非ヒト形質転換動物、及び形質転換組織等を提供しようとするものである。

【0005】

【課題を解決するための手段】

発明者らは、慢性心不全、慢性関節リウマチ、神経変性疾患、腎不全の共通現象である細胞機能低下、細胞死を誘導する共通原因を見出すため、一連の実験を行った。

(1) 心不全

先ず、慢性心不全における代償期の破綻の原因を究明するため、心肥大から慢性心不全の進行に伴う、組織における各種のタンパク質の発現変化を測定した。組織抽出液中の蛋白質混合液を水可溶性画分と界面活性剤可溶性画分の粗画分に分離し、それぞれを2次元電気泳動によって解析した。慢性心不全の病態モデルラットとして大動脈狭窄ラット、動静脈シャントラット、遺伝的高血圧症ラット(SHR)、ダール食塩感受性ラット、心筋梗塞後心不全モデルラットを用いて比較解析を行った。多くのモデルで共通して代償期の破綻とともに発現量の変化する蛋白質を検索し、普遍的な慢性心不全関連蛋白質群を得た。その中の1つであるAOP-1タンパク質が、代償期の破綻とともに発現減少していることを見出した。

【0006】

慢性心不全の進行に伴う当該蛋白質の変化が、遺伝子発現レベルにおいて調節を受けたことによるかどうか調査するために、遺伝子発現解析を実施した。その結果、検討したすべてのモデルで当該遺伝子の発現抑制が見られたことから、慢性心不全の進行にともなうAOP-1の減少は、遺伝子発現調節を受けた結果であることが示された。また、2型PeroxioredoxinであるThiol-specific antioxidant (TSA) の遺伝子発現変化と、抗酸化活性機能において共通性のあるsuperoxide dismutase(SOD), catalaseの遺伝子発現解析を行ったところ、TSA, SOD, catalaseは遺伝子発現量に変化が無いことが判明した。よって、AOP-1は、peroxiredoxinファミリー、代表的抗酸化蛋白の中で、特徴的に心不全期への移行に伴い発現減少することが判明した。

【0007】

そこで、AOP-1の機能が、心臓機能の改善もしくは増悪化に対して何らかの作用を持つかどうか検証を行った。まず、ラットAOP-1遺伝子の全長遺伝子を単離し、適当な発現ベクターを構築した後、AOP-1遺伝子をラット培養心筋細胞へ導

入した。培養細胞を無酸素にて培養した無酸素処理、無酸素培養後再酸素化しさらに一定期間培養を行った再酸素化処理、通常酸素濃度下で培養した無処理、の各実験条件においてAOP-1遺伝子導入群と、強制的な遺伝子発現、蛋白質生産による影響を加味し無害無益な遺伝子である大腸菌 β -galactosidase 遺伝子を導入したコントロール群とで比較解析を行った。比較方法1として生存細胞数の確認、比較方法2として生存細胞中で自律拍動を示す細胞数の確認、比較方法3としてMTT法 (T. Mosmann et.al. J. Immunol. Methods 65 (1983), pp. 55-63) により生存細胞数と細胞代謝活性の確認を行った。以上3点の比較検討を行った結果、コントロール群に対してAOP-1遺伝子導入群は、生存細胞数が無酸素処理、再酸素化処理で有意に上昇し、同時に自律拍動能を持つ細胞数も有意に増加した。またMTT法では、コントロール群に対してAOP-1遺伝子導入群は、無酸素処理、再酸素化処理、無処理において高値を示し、障害時の生存細胞数の増加と、障害、正常時での代謝活性の亢進を示した。つまり、無酸素傷害、再酸素化傷害に対して、AOP-1は細胞生存率、細胞機能維持の両面で高い有効性を示すことが判明した。さらに我々は、AOP-1遺伝子の相補鎖を発現するようにデザインした、anti-AOP-1発現アデノウイルスベクター (anti-AOP-1ベクター) を構築した。一般に、この種のベクターから発現されたmRNAは内在性AOP-1遺伝子から発現したmRNAと相補的に結合し、蛋白質への翻訳を阻害すると報告されている (Gene, 91(1990) 261-265)。我々は、anti-AOP-1ベクター、AOP-1発現ベクター、 β -galactosidase発現ベクターを心筋細胞に導入し、未導入細胞と共に3日間培養を行った。それぞれに対し、MTT assayを行ったところ、anti-AOP-1ベクターを導入したもので色素生成が抑制され、巨視的に生存細胞数の減少が観察された。つまり、anti-AOP-1ベクターによって内在性AOP-1の発現が抑制されたことが、細胞の生存に対して負の影響を及ぼしていることが判明した。先に我々は、抗酸化機能で共通性のあるSOD, catalaseは代償機構の破綻、慢性心不全、慢性関節リウマチ、神経変性疾患、腎不全への移行に伴い発現量は変化しないことを見出し、抗酸化作用および細胞代謝活性化作用を有するAOP-1が減少することが、代償機構破綻の一因をなす可能性が示された。この理由から、不全心に対するAOP-1の補充は、SOD, Catalaseの過剰発現よりも優位な保護作用を有することが

示唆される。

【0008】

一般に、酸素欠乏状態における細胞内では、好氣的エネルギー産生系から嫌氣的エネルギー産生系への切り替えが起こることが知られる(Trends Cardiovasc Med 1998;8:24-33)。これによりクエン酸の蓄積等による細胞内酸性化傷害、また嫌氣的エネルギー産生系が好氣的エネルギー産生系に対して非効率である故の細胞内エネルギー枯渇傷害が発生すると考えられている。また、再酸素化時にはミトコンドリアにおいて活性酸素種が発生することが示されており(Free Radic Biol Med 1992 Oct;13(4):289-97)、蛋白質、DNA、細胞膜リン脂質等の酸化を経て細胞に傷害を与える。本発明において我々が初めて報告する結果から、AOP-1は心筋細胞におけるこれらの傷害作用を除去し、細胞の正常な機能を維持する活性を有することが明らかとなった。本発明で特に注目すべき点は、AOP-1が再酸素化における活性酸素傷害のみならず、無酸素状態における各種傷害つまり、エネルギー枯渇傷害と細胞内酸性化傷害をも保護できたことであり、さらには通常酸素濃度下における培養、即ち無傷害状態で細胞代謝機能を活性化したことである。即ち、AOP-1の細胞機能保護作用及び細胞死抑制作用は、単に抗酸化作用のみならず、細胞代謝活性化作用を含む新たな機能に基づいてもたらされることが強く示唆された。

【0009】

さらにAOP-1が生体内で保護作用を発現するかどうか検証する目的でAOP-1遺伝子を心臓内に導入し、以下の解析を行った。遺伝子を導入後、蛋白質の発現を待ち、心臓をすばやく摘出し灌流装置に接続した。心臓を血液と同等量のガスを含んだ溶液で灌流することで摘出による傷害を抑え、生体内と同等の条件下で心臓機能を保持することに努めた。この心臓を虚血状態にする目的で一時的に灌流を停止し、また再酸素化することによる影響を調べる目的で再灌流を行った。AOP-1を強制発現させた心臓は、陰性対照蛋白である β -galactosidaseを発現する心臓に対して、虚血時の心機能が良好に維持され、さらに再灌流時の機能回復が優位であることが判明した。この結果から、AOP-1は培養細胞のみならず、生体内においても虚血傷害、再灌流傷害を共に保護することが判明した。

【0010】

虚血性心不全のみならず非虚血性の慢性心不全においても、心肥大に起因する心筋組織内血行不全が報告されていることから(Chin Med Sci J, 10(3):151-7 1995 Sep)、虚血、虚血再灌流は、慢性心不全病態に普遍的な傷害要因であると考えられる。故に、当該蛋白質を慢性心不全もしくは慢性心不全兆候を示す病態の心臓に補充することは、心筋細胞死を保護すると同時に、心臓拍出機能を維持させる慢性心不全に対する有効な治療方法となり得ることが示唆される。

(2) 心臓以外の疾患形成部位

次に、AOP-1の機能が心臓以外の臓器においても、疾患形成に対して原因であるかどうかを調査する目的で、他の疾患臓器における遺伝子発現解析を行った。結果、腎炎モデルにおける腎、神経変性疾患モデルにおける脳及びコラーゲン誘発関節モデルにおける関節においてもAOP-1の発現が低下することが判明した。よって、AOP-1の発現低下が、多くの疾患における普遍的病態形成・悪化に対する一因であることが強く示唆され、AOP-1機能の補充は、多くのAOP-1遺伝子又はAOP-1の発現減少に伴う疾患の治療に対して有効であることが示唆された。

【0011】

ア. 脳

脳血管性細胞傷害では、細胞外グルタミン酸濃度の上昇によりGlutamate receptor (NMDAレセプター)の過剰な活性化が生じる。NMDAレセプターの活性化を受けた細胞は、そのカルシウムチャネルを開口させ、細胞内へのカルシウム流入を起こす。過剰なNMDAレセプターの活性化は、細胞にカルシウム過負荷状態をもたらす。このカルシウム過負荷によって神経細胞がアポトーシスもしくは、ネクローシスを起こし、脳機能障害が不可逆的なものとなる。先に示したようにAOP-1は多くの疾患に対し有効性を示す可能性があるが、実際にAOP-1が培養ニューロンにおけるカルシウム過負荷傷害を保護しうるかどうか検証した。結果、AOP-1遺伝子導入細胞は、有意に細胞死が抑制された。さらに、無負荷状態においては、神経突起の伸展を促進しニューロンの機能であるネットワーク形成を活性化することが判明した。よって、AOP-1は脳細胞においても、活性酸素傷害のみならずカルシウム過負荷に対する細胞保護作用をも有し、高い有用性を示すことが判

明した。

【0012】

神経変性疾患動物モデルにおける有効性を確認するために、イボテン酸における脳障害モデルに対する解析を行った。イボテン酸は、NMDA受容体の作動薬であり、細胞内カルシウム過剰流入を惹起し、神経細胞死を誘発する。脳の海馬にAOP-1発現遺伝子を導入し、AOP-1の発現を誘導した後、同部位にイボテン酸を注入した。2日後脳を摘出し神経細胞を観察した。AOP-1遺伝子を導入していないものを対象群として比較解析すると、明らかにAOP-1遺伝子を導入した脳では、神経細胞死が抑制されていた。よって、AOP-1は脳内の神経細胞に対しても保護作用を有することが判明した。

【0013】

イ. 関節

慢性関節リウマチでの有効性を確認する目的で、コラーゲン誘発関節炎モデル(CIAモデル)に対する解析を行った。CIAモデルは、牛コラーゲンをマウスに注射することによる、牛コラーゲンに対する免疫感作により、マウス自己コラーゲンに対する免疫作用が誘導され、自己免疫性関節炎を誘発するものである。本モデルは、慢性関節リウマチの基礎モデルとしての認識が一般化している。本モデルに牛コラーゲンを注入後、関節炎発症前に関節内にAOP-1遺伝子を導入した。AOP-1遺伝子を導入していない物を対照群として比較解析を行ったところ、明らかにAOP-1遺伝子を導入した群で関節炎病態への進行が抑制された。よって、AOP-1は慢性関節炎に対する有効性を有することが判明した。

【0014】

ウ. 腎臓

慢性腎不全に対するAOP-1遺伝子の有効性を確認するため、Thy-1腎炎モデルに対する解析を行った。Thy-1腎炎モデルとは、腎糸球体細胞であるメサングウム細胞に特異的に発現するThy-1 cell surface antigen (Thy-1) 蛋白に対する抗体を注入することでThy-1に対する自己免疫感作を行う物であり、自己免疫作用によって、メサングウム細胞の細胞死と、続いて尿細管の傷害が発生するものである。一般にThy-1腎炎モデルは炎症を主体とする腎不全モデルと考えられてい

る。Thy-1抗体と同時にAOP-1遺伝子を注入し、経時的に例えば血中クレアチンを指標として腎機能を測定した。AOP-1非導入群を対象として比較解析した結果、AOP-1遺伝子導入群では有意に腎機能低下が抑制された。よって、AOP-1は慢性腎不全に対する有効性を有すると考えられる。

【0015】

我々は、正常なAOP-1の量が減少することが、当該疾患群の原因の一つであることを見出した。AOP-1の量が減ずることは、細胞内のAOP-1機能が減少したことに同義である故、遺伝的変異によってAOP-1の機能が低下した当該疾患も本特許の範疇に含むことが出来る。

【0016】

以上により、AOP-1は、従来精製蛋白の機能として知られた抗酸化作用に加えて、今回我々が新たに見出した細胞代謝活性化作用を含む新たな作用に基づく細胞機能保護作用及び細胞死抑制作用や、カルシウム過負荷に対する細胞機能保護作用を有することが判明した。また、今回我々が示したAOP-1の細胞機能保護作用及び細胞死抑制作用が慢性心不全、慢性腎不全、神経変性疾患、慢性関節リウマチをはじめとする多くのAOP-1遺伝子又はAOP-1の発現減少を伴う疾患の治療に対して有効であること見出し、本発明を完成した。

【0017】

なお、本発明においてAOP-1遺伝子又はAOP-1の発現減少を伴う疾患とは、患部組織（例えば、心不全であれば心臓、脳であれば神経細胞、リウマチであれば関節等）において、AOP-1遺伝子又はAOP-1の発現低下を呈する細胞を含有することを意味する。

【0018】

即ち、本発明は以下の事項に係るものである。

(1) AOP-1遺伝子又はAOP-1の発現減少を伴う疾患の予防又は治療方法において、(1) AOP-1をコードする核酸、若しくはAOP-1のアミノ酸配列中のアミノ酸が1つ以上付加、欠失、置換されたAOP-1の機能を有するポリペプチドをコードする核酸を導入すること、又は(2) AOP-1遺伝子の発現を増強する物質、AOP-1の産生を増強する物質若しくはAOP-1の機能を増強する物質を投与すること、か

らなる当該予防又は治療方法。なお、AOP-1遺伝子とは、通常、AOP-1をコードする核酸配列（エクソン配列）とその間にある核酸配列（イントロン配列）、さらにAOP-1遺伝子の転写を制御する核酸配列を含むことを意味するが、本発明において、特に明示されている場合を除き、AOP-1遺伝子とはAOP-1mRNAを意味する。

【0019】

(2) AOP-1遺伝子に係る核酸又はAOP-1のアミノ酸配列中のアミノ酸が1つ以上付加、欠失、置換されたAOP-1の機能を有するポリペプチドをコードする核酸を患部組織に導入することからなる上記(1)記載の予防又は治療方法。

【0020】

(3) AOP-1遺伝子の発現を増強する物質を投与することからなる上記(1)記載の予防又は治療方法。

(4) AOP-1の産生を増強する物質を投与することからなる上記(1)記載の予防又は治療方法。

【0021】

(5) AOP-1の産生を増強する作用を有する物質が、AOP-1遺伝子に係る核酸又はAOP-1のアミノ酸配列中のアミノ酸が1つ以上付加、欠失、置換されたAOP-1の機能を有するポリペプチドをコードする核酸である上記(4)記載の予防又は治療方法。

【0022】

(6) AOP-1の機能を増強する物質を投与することからなる上記(1)記載の予防又は治療方法。

(7) AOP-1遺伝子又はAOP-1の発現減少を伴う疾患が、慢性心不全、慢性関節リウマチ、神経変性疾患又は腎不全である上記(1)乃至(6)記載の予防又は治療方法。

【0023】

(8) (1) AOP-1をコードする核酸若しくはAOP-1のアミノ酸配列中のアミノ酸が1つ以上付加、欠失、置換されたAOP-1の機能を有するポリペプチドをコードする核酸、又は(2) AOP-1遺伝子の発現を増強する物質、AOP-1の産生を増強

する物質若しくはAOP-1の機能を増強する物質、を有効成分として含有するAOP-1遺伝子又はAOP-1の発現減少を伴う疾患の予防薬又は治療薬。

【 0 0 2 4 】

(9) AOP-1遺伝子に係る核酸又はAOP-1のアミノ酸配列中のアミノ酸が1つ以上付加、欠失、置換されたAOP-1の機能を有するポリペプチドをコードする核酸を有効成分として含有する上記 (8) 記載の予防薬又は治療薬。

【 0 0 2 5 】

(1 0) AOP-1遺伝子の発現を増強する物質を有効成分として含有する上記 (8) 記載の予防薬又は治療薬。

(1 1) AOP-1の産生を増強する物質を有効成分として含有する上記 (8) 記載の予防薬又は治療薬。

【 0 0 2 6 】

(1 2) AOP-1の産生を増強する作用を有する物質が、AOP-1をコードする核酸又はAOP-1のアミノ酸配列中のアミノ酸が1つ以上付加、欠失、置換されたAOP-1の機能を有するポリペプチドをコードする核酸である上記 (1 1) 記載の予防薬又は治療薬。

【 0 0 2 7 】

(1 3) AOP-1の機能を増強する物質を有効成分として含有する上記 (8) 記載の予防薬又は治療薬。

(1 4) AOP-1遺伝子又はAOP-1の発現減少を伴う疾患が、慢性心不全、慢性関節リウマチ、神経変性疾患又は腎不全である上記 (8) 乃至 (1 3) 記載の予防薬又は治療薬。

【 0 0 2 8 】

(1 5) AOP-1遺伝子の発現量又はAOP-1の産生量を測定し、当該発現量又は産生量を指標として診断することからなるAOP-1遺伝子又はAOP-1の発現減少を伴う疾患の診断方法。

【 0 0 2 9 】

(1 6) AOP-1遺伝子又はAOP-1の発現減少を伴う疾患が、慢性心不全、慢性関節リウマチ、神経変性疾患又は腎不全である上記 (1 5) 記載の診断方法。

(17) AOP-1遺伝子の発現量又はAOP-1の産生量を指標として測定する手段を含むAOP-1遺伝子又はAOP-1の発現減少を伴う疾患の診断剤又は診断キット。

【0030】

(18) AOP-1遺伝子又はAOP-1の発現減少を伴う疾患が、慢性心不全、慢性関節リウマチ、神経変性疾患又は腎不全である上記(17)記載の診断剤又は診断キット。

【0031】

(19) AOP-1の産生を抑制、AOP-1遺伝子の発現を抑制又はAOP-1遺伝子を欠失することによりAOP-1遺伝子又はAOP-1の発現減少を伴う疾患の疾患モデルとして使用できる非ヒト形質転換動物。

【0032】

(20) AOP-1遺伝子又はAOP-1の発現減少を伴う疾患が、慢性心不全、慢性関節リウマチ、神経変性疾患又は腎不全である上記(19)記載の非ヒト形質転換動物。

【0033】

(21) AOP-1の産生を抑制、AOP-1遺伝子を発現抑制又はAOP-1遺伝子を欠失することによりAOP-1遺伝子又はAOP-1の発現減少を伴う疾患の組織モデル又は細胞モデルとして使用できる形質転換組織又は形質転換細胞。

【0034】

(22) AOP-1遺伝子又はAOP-1の発現減少を伴う疾患が、慢性心不全、慢性関節リウマチ、神経変性疾患又は腎不全である上記(20)記載の形質転換組織又は形質転換細胞。

【0035】

(23) 上記(18)乃至(21)記載の非ヒト形質転換動物、形質転換組織又は形質転換細胞に、合成若しくは遺伝子組換え技術により得られた物質、天然由来の物質又はそれらの誘導体である物質を投与又は添加し、AOP-1遺伝子の発現量またはAOP-1の産生量を検出することを含む、AOP-1遺伝子の発現を増強する物質、AOP-1の産生を増強する物質及びAOP-1の機能を増強する物質からなる群から選ばれる少なくとも1つをスクリーニングする方法。

【0036】

(24) 合成若しくは遺伝子組換え技術により得られた物質、天然由来の物質又はそれらの誘導体である物質を、(1) AOP-1遺伝子の転写制御領域及びAOP-1遺伝子若しくはレポーター遺伝子を有する形質転換細胞又は試験管内発現系と接触させ、AOP-1遺伝子又はレポーター遺伝子の発現量を検出すること、又は(2) AOP-1又はAOP-1の標的分子と接触させ、AOP-1又はAOP-1の標的分子の量を検出すること、を含むAOP-1遺伝子の発現を増強する物質、AOP-1の産生を増強する物質及びAOP-1の機能を増強する物質からなる群から選ばれる少なくとも1つをスクリーニングする方法。

【0037】

(25) AOP-1遺伝子の転写制御領域をレポーター遺伝子の翻訳領域の上流又は下流に連結した発現ベクターを構築後、適当な宿主細胞に導入して培養し、当該培養細胞に合成若しくは遺伝子組換え技術により得られた物質、天然由来の物質又はそれらの誘導体である物質を添加し、一定時間後にレポーター遺伝子の発現量又はレポータータンパク質の産生量の変化を検出することを含む上記(24)記載のスクリーニング方法。

【0038】

(26) 合成若しくは遺伝子組換え技術により得られた物質、天然由来の物質又はそれらの誘導体である物質をAOP-1又はAOP-1の標的分子と接触させ、当該物質と結合した又は結合しなかったAOP-1又はAOP-1の標的分子の量を検出することを含む上記(25)記載のスクリーニング方法。

【0039】

(27) AOP-1又はAOP-1の標的分子を支持体に固定化し、当該固定化したAOP-1又はAOP-1の標的分子に、合成若しくは遺伝子組換え技術により得られた物質、天然由来の物質又はそれらの誘導体である物質とAOP-1又はAOP-1の標的分子を添加し、結合した又は結合しなかったAOP-1又はAOP-1の標的分子の量を検出することを含む上記(24)記載のスクリーニング方法。

【0040】

(28) 合成若しくは遺伝子組換え技術により得られた物質、天然由来の物質

又はそれらの誘導体である物質を支持体に固定化し、当該固定化した物質にAOP-1又はAOP-1の標的分子を添加し、結合した又は結合しなかったAOP-1又はAOP-1の標的分子の量を検出することを含む上記（24）記載のスクリーニング方法。

【0041】

（29）合成若しくは遺伝子組換え技術により得られた物質、天然由来の物質又はそれらの誘導体である物質を、AOP-1又はAOP-1の標的分子と接触させ、AOP-1の抗酸化又は過酸化亜硝酸消去機能を測定することを含むAOP-1の機能を増強する物質のスクリーニング方法。

【0042】

（30）AOP-1又はAOP-1の標的分子に、合成若しくは遺伝子組換え技術により得られた物質、天然由来の物質又はそれらの誘導体である物質とAOP-1又はAOP-1の標的分子を添加し、AOP-1の抗酸化又は過酸化亜硝酸消去能を測定することを含む上記（29）記載のスクリーニング方法。

【0043】

（31）AOP-1又はAOP-1の標的分子を支持体に固定化し、当該固定化したAOP-1又はAOP-1の標的分子に、合成若しくは遺伝子組換え技術により得られた物質、天然由来の物質又はそれらの誘導体である物質とAOP-1又はAOP-1の標的分子を添加し、AOP-1の抗酸化又は過酸化亜硝酸消去機能を測定することを含む上記（29）記載のスクリーニング方法。

【0044】

（32）合成若しくは遺伝子組換え技術により得られた物質、天然由来の物質又はそれらの誘導体である物質を支持体に固定化し、当該固定化した物質にAOP-1又はAOP-1の標的分子を添加し、AOP-1の抗酸化又は過酸化亜硝酸消去機能を測定することを含む上記（29）記載のスクリーニング方法。

【0045】

（33）（1）AOP-1遺伝子に係る核酸若しくはAOP-1のアミノ酸配列中のアミノ酸が1つ以上付加、欠失、置換されたAOP-1の機能を有するポリペプチドをコードする核酸、又は（2）AOP-1遺伝子の発現を増強する物質、AOP-1の産生を増強する物質若しくはAOP-1の機能を増強する物質の、AOP-1遺伝子又はAOP-1の発

現減少を伴う疾患の予防薬又は治療薬の製造のための使用。

【 0 0 4 6 】

(3 4) AOP-1遺伝子に係る核酸又はAOP-1のアミノ酸配列中のアミノ酸が1つ以上付加、欠失、置換されたAOP-1の機能を有するポリペプチドをコードする核酸を有効成分として含有する上記 (3 3) 記載の使用。

【 0 0 4 7 】

(3 5) AOP-1遺伝子の発現を増強する物質を有効成分として含有する上記 (3 3) 記載の使用。

(3 6) AOP-1の産生を増強する作用を有する物質が、AOP-1をコードする核酸又はAOP-1のアミノ酸配列中のアミノ酸が1つ以上付加、欠失、置換されたAOP-1の機能を有するポリペプチドをコードする核酸である上記 (3 5) 記載の使用。

【 0 0 4 8 】

(3 7) AOP-1の産生を増強する物質を有効成分として含有する上記 (3 3) 記載の使用。

(3 8) AOP-1の機能を増強する物質を有効成分として含有する上記 (3 3) 記載の使用。

【 0 0 4 9 】

(3 9) AOP-1遺伝子又はAOP-1の発現減少を伴う疾患が、慢性心不全、慢性関節リウマチ、神経変性疾患又は腎不全である上記 (3 3) 乃至 (3 8) 記載の使用。

【 0 0 5 0 】

【発明の実施の形態】

本発明に係るAOP-1遺伝子又はAOP-1の発現減少を伴う疾患の予防薬又は治療薬の有効成分として使用できる物質には以下の (1) 乃至 (3) に係る物質を挙げることができる。

【 0 0 5 1 】

(1) AOP-1遺伝子の発現を増強する作用を有する物質

AOP-1遺伝子の発現を増強する作用を有する物質は、合成若しくは遺伝子組換え技術により得られた化合物又は天然由来の化合物並びにそれらの誘導体のいず

れでもよいが、そのような物質としては、例えばAOP-1遺伝子のプロモーターやエンハンサー領域に作用しAOP-1遺伝子のmRNAへの転写を増強する作用を持つ物質、又は細胞中の転写因子等を介して同様の作用を示す物質（例えば、転写因子やco-activatorに結合し、DNAや他の転写因子、co-activatorへの結合を促進する物質、若しくは転写抑制因子やco-repressorに結合し、DNAや他の転写因子、co-repressorへの結合を抑制する物質等）が挙げられる。

【0052】

(2) AOP-1の産生を増強する作用を有する物質

AOP-1の産生を増強する作用を持つ物質は、合成若しくは遺伝子組換え技術により得られた化合物又は天然由来の化合物並びにそれらの誘導体のいずれでもよいが、そのような物質としては、例えばAOP-1をコードする核酸（RNA又はDNA：配列番号1乃至3）又はAOP-1のアミノ酸配列中のアミノ酸が1つ以上付加、欠失、置換されたAOP-1の機能を有するポリペプチドをコードする核酸（RNA又はDNA）が挙げられる。また、これらをウイルス改変ベクター等他の生物遺伝子中に挿入した物質も同様である。例えば、ウイルスベクター、好ましくはレンチウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、更に好ましくはアデノウイルスベクター、又は化学合成リポソーム、ウイルスエンベロープ、若しくはウイルスエンベロープと合成リポソームの複合体等に、宿主細胞内で機能するようなプロモーター配列、例えばサイトメガロウイルスプロモーター(CMV promoter)等、の下流にAOP-1遺伝子を組み込んだ核酸配列を組み込んだものを挙げることもできる。

【0053】

また、TNF- α の場合、転写後mRNAの安定性によってTNF- α 産生が調節されており、HuR蛋白質の結合により安定化されることが知られているが、同様に、AOP-1 mRNAと結合する物質若しくは蛋白質あるいは核酸で、AOP-1 mRNAの分解を阻害する物質若しくは、翻訳の効率を上昇させる活性を有する物質も挙げることができる。

【0054】

(3) AOP-1の機能を増強する作用を有する物質

AOP-1は、活性部位システイン残基の酸化還元を酵素的に可逆化することによって酸化並びに過酸化亜硝酸活性を消去する。AOP-1の機能を増強する物質は、合成若しくは遺伝子組換え技術により得られた化合物又は天然由来の化合物並びにそれらの誘導体のいずれでもよいが、そのような物質としては、例えばこの活性化部位システイン残基に結合し、酸化還元サイクルを促進させる物質や、AOP-1の活性部位以外に結合しアロステリック効果によって活性部位の酸化還元サイクルを促進させる物質を挙げることができる。また、AOP-1とAOP-1が作用するAOP-1標的分子（例えば、受容体）の結合や細胞内でのシグナル伝達を促進し、AOP-1のもつ活性を亢進する物質が挙げられる。例えば、thioredoxinタンパク質はAOP-1に結合し、生化学的な抗酸化活性を上昇させることが分かっている。このようなAOP-1機能を増強させる蛋白質それ自体又は遺伝子の導入、化学合成物質等による誘導を介して、間接的にAOP-1の機能を増強することで、有効性を発揮する物質が挙げられる。また、AOP-1を特異的に分解するプロテアーゼの活性阻害物質等も含まれる。

【0055】

（4）製剤

上記のような物質を有効成分として含有する製剤は、通常の製剤化の際に用いられる担体や賦形剤、その他の添加剤を用いて調製される。

【0056】

本発明に係る医薬組成物の有効成分は、遊離型であっても、その医薬的に許容し得る塩であってもよい。無機酸との塩としては、例えば塩酸、硫酸、リン酸との塩が挙げられ、あるいは有機酸との塩としては、例えばギ酸、酢酸、酪酸、コハク酸、クエン酸等との酸付加塩として用いることができる。塩は、ナトリウム、カリウム、リチウム、カルシウム等の金属塩、有機塩基による塩の形態であってもよい。

【0057】

有効成分は、公知の薬理学的に許容し得る担体、賦形剤、希釈剤等と混合して医薬に一般に使用されている投与方法、例えば、経口投与方法、又は静脈内投与、筋肉内投与もしくは皮下投与等の非経口投与方法によって投与するのが好まし

い。本発明の医薬組成物は、例えば、有効成分を生理学的に許容される担体、香味剤、賦形剤、安定剤、希釈剤、乳濁剤、溶液剤、懸濁剤、シロップ剤等と、適宜混和することにより製造することができ、錠剤、散剤、顆粒剤、溶液剤等としてもちいることができる。錠剤などに混和することができる添加剤としては、例えばゼラチンのような結合剤、コーンスターチのような潤滑剤等を用いることができ、また糖衣又は易溶性若しくは腸溶性物質のフィルムにより被膜してもよい。カプセルの剤型である場合には、前記の組成物に更に液状担体を含有させることができる。注射のための無菌組成物も、通常の処方を用いて製造することができる。注射用の水性液としてはブドウ糖などを含む等張液などがあげられ、ポリエチレングリコールのような適当な溶解補助剤などと併用してもよい。また、緩衝剤、安定剤、保存剤、酸化防止剤、無痛化剤などと配合してもよい。有効成分がペプチドの場合、経口投与では消化管内で分解を受けるため、この投与方法は一般的には効果的ではないが、消化管内で分解を受けにくい製剤、例えば活性成分であるペプチドをリポソーム中に包容したマイクロカプセル剤として経口投与することも可能である。また、直腸、鼻腔内、舌下などの消化管以外の粘膜から吸収せしめる投与方法も可能である。この場合は座剤、点鼻スプレー、舌下錠といった形態で投与することができる。

【0058】

また、遺伝子治療に用いる場合にはウイルスベクター、好ましくはレンチウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、更に好ましくはアデノウイルスベクター、又は化学合成リポソーム、ウイルスエンベロープ、若しくはウイルスエンベロープと合成リポソームの複合体等公知の遺伝子治療に適した媒体に、宿主細胞内で機能するようなプロモーター配列、例えばサイトメガロウイルスプロモーター(CMV promoter)等、の下流にAOP-1遺伝子又はAOP-1遺伝子の発現を増強する物質、AOP-1の産生を増強する物質若しくはAOP-1の機能を増強する物質に係る核酸を組み込んだものを用いることができる。

【0059】

本発明の医薬組成物の投与量は、治療に用いられる場合、治療に有効な投与量が決められるが、当該投与量は投与対象者の年齢、体重、症状の程度及び投与経

路等によって異なり、個々の場合に応じて決められる。通常、経口投与による場合、成人一日当たりの投与量は0.1~1000mg程度であり、これを1ないし数回に分けて投与すればよい。

【0060】

(5) スクリーニング方法

本願発明に係る予防薬又は治療薬の有効成分として用いる物質のスクリーニング法としては、例えば以下の方法が挙げられる。

【0061】

AOP-1遺伝子の発現増強又はAOP-1の産生を増強する物質のスクリーニングに用いるAOP-1遺伝子若しくはAOP-1又はそれらの誘導体は、何れの種由来のものであってもよく、例えばヒト（AOP-1遺伝子：配列番号1、AOP-1：配列番号4）、ラット（AOP-1遺伝子：配列番号2、AOP-1：配列番号5）、マウス（AOP-1遺伝子：配列番号3、AOP-1：配列番号6）等哺乳動物由来のものが挙げられる。これらのうち、ヒトに対する予防薬又は治療薬の研究、開発に利用する上ではヒト由来のものを用いることが好ましい。また、動物モデル、即ち、AOP-1遺伝子を発現抑制又は欠失したことによる慢性心不全症状等を有する非ヒト形質転換動物を用いた研究、開発の必要性からは、例えばマウス、ラット等の動物由来のものを用いることが好ましい。但し、動物モデルを用いて薬剤スクリーニングを行う場合には、ヒト由来のものを用いることが望ましい。

【0062】

AOP-1遺伝子の発現を増強する物質、AOP-1の産生を増強する物質、又はAOP-1の機能を増強する物質のスクリーニング方法においては、レポーター遺伝子を利用した方法が一般に利用されている。レポーター遺伝子としては例えば、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)、 β -ガラクトシダーゼ(β -Gal)、ルシフェラーゼなどが利用できる。AOP-1遺伝子の発現を増強する物質は、例えば、AOP-1遺伝子の転写制御領域（プロモーター、エンハンサー領域等）をレポーター遺伝子の翻訳領域の上流又は下流に連結した発現ベクターを構築し、適当な培養細胞等に導入し、その培養細胞に試料である物質（当該物質は、合成若しくは遺伝子組換え技術により得られた化合物又は天然由来の化合物並びにそ

これらの誘導体のいずれでもよい) を添加して、一定時間後にレポーター遺伝子の発現量、またはレポータータンパク質の量を測定することによりスクリーニングすることができる。AOP-1 遺伝子の転写制御領域 (プロモーター、エンハンサー領域等) は市販の遺伝子 (genomic) ライブラリーから、AOP-1 cDNA の断片をプローブとしてプラークハイブリダイゼーションを行うことなどにより得ることができる。レポータータンパク質の量は酵素活性として測定することでもよいし、タンパク質の発現量として抗体などを用いて測定することでもよい。

【 0 0 6 3 】

また、AOP-1 の産生を増強する物質には、AOP-1 配列を含む DNA または、RNA が含まれ、これをリポソームや、ウイルス改変ベクターに組み込むことでも同様の効果を得る事が出来る。

【 0 0 6 4 】

AOP-1 の機能を増強する物質のスクリーニング方法としては、更に、過酸化水素と AOP-1、チオール基をもつ還元剤 (例えば dithiothreitol) 、酵素活性測定が可能なモニター酵素の 4 種類を混合し、一定時間後のモニター酵素活性を測定することで行うことが挙げられる (Biochemical and Biophysical Research Communications Vol. 199, No. 1, pp. 199-206, 1994) (Journal of Biological Chemistry Vol. 271, No. 26, pp. 15315-15321, 1996)。また、過酸化亜硝酸 (peroxynitrite: 例えば、酸性化亜硝酸塩と過酸化水素の混合によって得られる) の場合、過酸化亜硝酸と AOP-1、酵素活性測定が可能なモニター酵素又は過酸化亜硝酸によって修飾される物質 (例えば DNA) の 3 種類を混合し、一定時間後のモニター酵素活性又は物質の修飾量を測定することで行うことができる (Nature Vol. 407, 14, pp. 211-215)。即ち、ラジカル傷害によって、モニター酵素が失活することに対する AOP-1 の保護活性を測定することにより AOP-1 の機能を増強する物質をスクリーニングすることができる。

【 0 0 6 5 】

(6) 診断方法、診断剤及び診断キット

AOP-1 遺伝子は、その発現量が種々の疾患において疾患の悪化とともに減少することが本発明者らにより明らかにされた。患者のバイオブシーサンプルを用い

て、AOP-1遺伝子の発現量を測定することにより、慢性心不全の増悪化の程度を知ることができる。例えば、患者のバイオプシーサンプル100m g から ISOGEN（ニッポンジーン社）を用いて総RNAを抽出し、DNase処理を行った後に、c DNA合成を行い、適当なプライマーを用いて、PCR反応によりAOP-1遺伝子を増幅し、ゲル電気泳動によってAOP-1に相当するバンドの濃さを判定するなどの方法により、AOP-1遺伝子の発現量を測定することができる。AOP-1遺伝子発現の定量は、この方法に限らず、例えば実施例3に記載の方法やノーザンハイブリダイゼーション法、c DNAアレイ法などをはじめRNA, DNAの定量法であればどのような方法も利用できる。

【 0 0 6 6 】

また、本発明によりAOP-1遺伝子が種々の疾患の改善因子であることが示されたことにより、AOP-1遺伝子及びその制御領域に何らかの変異が存在することによりAOP-1の機能が低下したり、遺伝子発現量が減少したりする場合には、その変異を持つ個体は、慢性心不全等の疾患になり易い、あるいは、増悪化しやすい傾向を持つことが容易に考えられる。そこで、これらの遺伝子上の変異を試験することで、リスクファクターの診断が可能となる。遺伝子上の変異を知る方法としては、例えば、患者の血液サンプルから定法に従ってDNAを分離し、実施例1-5に記載の方法により、その塩基配列を決定し、正常な配列と比較することにより行うことができる。また、一旦変異と慢性心不全の関係が明確になれば、その変異のみを検出するDNAチップ法、SSCP法などが利用できる。

【 0 0 6 7 】

また、慢性心不全患者を伴う疾患に罹患した患者のバイオプシーサンプルを用いて、心筋細胞内AOP-1の濃度を測定することにより、慢性心不全もしくは、上記疾患の増悪化の程度を知ることができる。測定方法としては、例えば、AOP-1に対する抗体を利用したELISAまたはRIA法、HPLCやマスマススペクトロメトリーによる定量法などが利用できる。この際、AOP-1は完全な形である必要はなく、測定可能であれば断片化したものでも良い。

【 0 0 6 8 】

更に、本発明は上記の測定手段等を用いたAOP-1遺伝子の発現量又はAOP-1の産

生量を測定する手段を含む慢性心不全の診断剤又は診断キットを包含する。

(7) AOP-1遺伝子導入形質転換動物及び形質転換ヒト細胞または組織等

本願発明に係る物質の同定は上記(5)スクリーニング方法に記載したが、AOP-1の発現を抑制したことによる、慢性心不全症状等を有する非ヒト形質転換動物を利用して行う事も可能である。宿主動物たる非ヒト動物としては、マウス、ラット、ウサギなどの小動物のほか、イヌ、ブタ、ヒツジ、ウシなどの大動物も対象となり、遺伝子を発現し、機能や生理作用を確認しうる動物であればどのような動物でも良い。遺伝子発現を抑制することは、AOP-1転写調節領域に変異若しくは欠失等を導入することにより可能であるが、遺伝子発現を抑制するのであれば如何なる方法を用いても良い。また、AOP-1の産生抑制は、AOP-1mRNAに対して相補的なDNA又はRNAを導入もしくは、当該相補配列をコードする遺伝子を導入して得られるが、AOP-1の産生を抑制できれば如何なる方法を用いても良い。また、遺伝子欠失の方法としては、胎性幹細胞を用いたノックアウトマウス技術が挙げられるが、遺伝子の発現を抑制するシステムであればどのようなシステムを用いても良い。また、ヒト細胞、または組織にAOP-1遺伝子を導入したことによりストレス耐性化した形質転換細胞、形質転換組織を用いて、外科的な治療を行うことも可能である。例えば、心臓移植時にドナー心臓にあらかじめAOP-1遺伝子の導入を行ったものを用いることにより、移植後の拒絶反応に対し耐性を獲得させ、免疫抑制剤の投与量を減らすことが考えられる。また、心筋梗塞を呈した心臓では、虚血部位で心筋壊死が発生しているが、この領域に心筋細胞を補充する事で心機能が回復することが考えられる。しかし、壊死部での血流状態は悪く、単に心筋細胞を補充することでは移植心筋細胞のダメージも免れない。そこであらかじめAOP-1遺伝子を導入したことにより虚血に耐性を持たせた形質転換心筋細胞を移植に用いることによって、移植心筋細胞はより良好に機能することが予想される。

【0069】

【実施例】

実施例1：蛋白質2次元電気泳動法によるAOP-1の検索

1-1. 慢性心不全病態モデルラットの作製及び左心室サンプルの採取

A. ダール慢性心不全モデルラット

ダールラットはSpague-Dawley系ラットにおいて、8%の高食塩含有食を負荷し、継代交配を行うことにより、3代で高血圧易発性の食塩感受性ラット(Dahl-S)と、高血圧を生じない食塩抵抗性ラット(Dahl-R)とに分離されたものである。Dahl-Sラットについては京都大学の木原らの研究により、6週齢より8%の高食塩含有食を負荷することにより、代償性左室肥大を呈した後、収縮不全を伴う左室拡大、すなわち非代償性慢性心不全へと移行し、肺鬱血により死亡することが示されている (Am. J. Physiol., 267, H2471-2482(1994))。本モデルはモデルの作製に特殊な手法を必要とせず、短期間で慢性心不全を発症させることができ、また、一個体において代償肥大期と非代償慢性心不全期に明瞭に区分でき、ヒトの高血圧性慢性心不全と発症過程が類似している。

【 0 0 7 0 】

雄性ダール食塩感受性ラット(Dahl-S)(清水実験材料)を6週齢より8%高食塩含有食で飼育し、心肥大期(11週齢)および慢性心不全期(14週齢)に左心室を採取した。

B腹部大動脈狭窄ラット(圧負荷モデル：圧負荷によるラット心肥大モデル：A O B)の作製及び左心室サンプルの採取)

実験にはSprague-Dawley系の9週齢雄性ラットを用いた。ペントバルビタールナトリウム(40mg/kg)の腹腔内投与によりラットを麻酔し、腹臥位に固定して開腹後、腹部大動脈を露出させ、左右の腎動脈間の部分を剥離した。21G注射針を大動脈に沿わせ、左右の腎動脈間で大動脈とともに絹糸で結紮し、その後注射針を引き抜くことにより、大動脈狭窄を行った。本モデルにおいてはこのような腹部大動脈狭窄により収縮期血圧が上昇し、心臓の後負荷が増大して、左心室の肥大が生じる。偽手術[Sham-operation (Sham)]群には腹部大動脈の剥離のみを施した。

【 0 0 7 1 】

動脈の狭窄により収縮期血圧は手術後3ヶ月目、17ヶ月目においてそれぞれ232mmHg, 188mmHgと通常より高い値を示した。3ヶ月目で、心重量/体重比の有意な

上昇を認め、さらに、17ヶ月目のラットは3ヶ月目に比べ心機能の指標であるFractional Shortening (FS)が52%から26%に低下した。よって狭窄手術後3ヶ月目を代償性肥大型、17ヶ月目を非代償慢性心不全期とし、それぞれの左心室ならびに偽手術群の左心室を採取した。

C. 腹部動静脈シャントラット(容量負荷モデル：容量負荷によるラット心肥大モデル)の作製及び左心室サンプルの採取：ACS)

実験にはSprague-Dawley系の9週齢雄性ラットを用いた。ペントバルビタールナトリウム(40mg/kg)の腹腔内投与によりラットを麻酔し、腹臥位に固定して開腹後、腹部大動静脈を露出させ、大動脈の腎動脈分岐部及び大腿動脈分岐部において、それぞれクランプで血流を停止した。止血した部位で大動脈内に18G注射針を挿入し、大静脈へと貫通させ、動静脈シャントを作製した。注射針を引き抜き、動脈部の傷口を手術用接着剤で塞ぎ、クランプをはずした。シャント部で静脈内に動脈血が流入するのを確認した後、閉腹した。本モデルにおいてはこのような腹部大動静脈シャントの形成により、静脈圧が上昇し、心臓の前負荷が増大して、右心房、右心室、左心房、左心室の順に負荷が加わり肥大が生じる。さらに、静脈系のコンプライアンスが低いため血液が貯流し、肺うっ血を呈する。偽手術[Sham-operation (Sham)]群には腹部大動静脈の剥離のみを施した。

【0072】

術後、3ヶ月、11ヶ月において、心エコーによる心機能測定を行った後、解剖、心重量ならびに解剖所見を確認した。手術後3ヶ月目に比べ11ヶ月目のラットではヘマトクリット値が低下すると共に全例で肺水腫が生じており、容量負荷が進行したものと思われた。また右心系の心重量/体重比や肺重量/体重比が増加し、右心室から肺にかけての鬱血が示唆された。FSは57%から31%に低下した。したがってシャント手術後3ヶ月目を代償期、11ヶ月目を非代償慢性心不全期と判断し、それぞれの左心室ならびに偽手術群の左心室を採取した。

D. 自然発症高血圧ラット(圧負荷モデル)の作製及び左心室サンプルの採取)

自然発症高血圧ラットとして知られているSHRラットを飼育し、経時的に血圧、心エコー測定を行った。3ヶ月齢のSHRは血圧および心重量／体重比が通常より高く、高血圧による心肥大を呈していた。19ヶ月齢では、立毛、うずくまりなどの外見に加え、FSは56%から32%に低下、収縮期血圧も低下し慢性心不全を呈した。さらに、胸水、浮腫などの症状が見られた。それぞれ解剖によって左心室を採取した。

E. 心筋梗塞後心不全モデルラットの作製及び左心室サンプルの採取)

体重180g-200gのSprague-Dawley(SD)ラットを用いて冠動脈の結紮を行った。結紮後4週後、心機能の測定、心臓摘出後、心肺重量（左右心室、肺）の測定を行った。心機能では、拡張末期圧、最大収縮期圧の測定を行った。拡張末期圧は心不全の悪化に伴い上昇するが、今回のモデルでは、sham群に対しVehicle群では3.1倍の上昇が見られた。最大収縮期圧はsham群に対しVehicle群では29%低下した。右心室重量と体重の比は、心肥大に伴い上昇するが、今回のモデルではsham群に対しVehicle群で2.2倍の上昇が見られた。肺重量は心機能の低下に伴ううっ血のため上昇するが、今回のモデルでは、sham群に対しVehicle群で2.3倍の上昇が見られた。よって、本モデルは、心筋梗塞後の心肥大による代償期を経て心不全に至る典型的な心不全モデルであると思われる。

【0073】

解剖によって左心室非梗塞領域を採取した。

1-2. 蛋白質サンプルの作製

rat heart 1/4 量に対し、1mlのhomogenize buffer 1 (20mM Tris HCl pH7.4, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 1mM PMSF) を添加した。Homogenizerを用いて組織を破壊した後さらに、超音波処理を施した。遠心操作で上清を得、可溶性の蛋白画分とした。沈殿を同homogenize bufferにて洗浄した後、沈殿と同体積のhomogenize buffer 2 (homogenize buffer 1 +2% triton X100) を加え再混合して遠心後の上清を膜蛋白質・膜相互作用蛋白画分とした。

1-3. 蛋白質の定量

蛋白中のペプチド結合が銅の二価イオンをキレートし、Bicinchoninic acid (BCA) と反応して紫色を呈する現象を利用した BCA法を簡便化したPierce社製の蛋白質定量キットを用いて行った。標準蛋白にはキット付属の牛血清アルブミンを用いた。

1-4. 二次元電気泳動

A. 一次元電気泳動

125~750 μ g相当の蛋白質をサンプルバッファー (8M Urea, 0.5% Triton X-100, 10mM DTT, Orange G 微量) に懸濁し、これをもって乾燥ゲル (Pharmacia Biotech. 社製 Immobiline Drystrip) を膨潤させた。Pharmacia Biotech. 社製 Multiphor II を用い、製造者の標準操作方法にて泳動を行った。泳動後は -20℃ にて 1 週間を限度に保存し、随時二次元電気泳動に供した。

B. 二次元電気泳動

上記ゲルを平行化バッファー (50mM Tris-HCL, 6M Urea, 30% glycerol, 1% SDS) を用いて前処理した後、poly acrylamide gel 上に設置した。これを Biorad 社製の電気泳動装置を用いて泳動した。泳動後直ちに蛋白をゲル中に固定化すると同時に銀染色法を用いて染色し、二次元電気泳動像を得た。

1-5 蛋白発現比較解析

同一サンプルに対して最低 2 回の電気泳動を行い、群内の最低 2 個体に関して発現変化に再現性のある蛋白をそれぞれのモデルでピックアップした。それらのピックアップされた蛋白の中で、多くのモデルで共通して変化する因子を慢性心不全関連蛋白質と位置づけた。その中で後述の実施例 1-6 によって AOP-1 と同定された蛋白質スポットを数値化したグラフを図 1 に示した。図 1 において、Dahl、AOB、ACS、SHR は、それぞれ上述した 1-1. A. から D. で作製した慢性心不全病態モデルラットをいう。

1-6 蛋白質の同定

A. 目的蛋白質のpolyacrylamide gelからの回収

ゲル片を適当なバッファーで洗いSDSを除いた。ゲル内にtrypsin(PROMEGA社)を浸透させ、ゲル中で目的蛋白質を消化することにより断片化し、ゲル網目から溶出させた。

B 質量分析によるAOP-1の同定

上記Aにて得られた目的蛋白質の断片群を混合物のままMicroMass社製質量分析機（エレクトロスプレー イオン化法／飛行型質量分析機）を用いて解析し、目的蛋白質断片群の質量情報を得た。さらに一部の断片にヘリウムガスを照射しペプチド結合の開裂を行うことによって、蛋白質断片の内部配列N末[H(I/L)SVNDL]C末と質量情報（親イオン分子量1206.6、娘イオン1069.481, 956.428, 869.418, 770.379, 656.336, 541.324, 428.244）を得た。これらの情報を基に、インターネット上で公開されている遺伝子配列データベースに対して検索を行いAOP-1を同定した（SwissProt Accession No. P20108：配列番号6）。

実施例 2：AOP-1遺伝子の発現解析

実施例 1 - 1 - A～Dに記載の方法にて得た左心室をサンプルとして用いた。

【 0 0 7 4 】

総RNAは各左心室よりISOGEN（ニッポンジーン社）を用いて説明書に記載の方法に従って調製し、DNase処理を行った。DNase処理した総RNAそれぞれ1μgより反応液50μlでTaqMan（登録商標） Reverse Transcription Reagents（PE Applied Biosystems社）を用いてcDNAを合成した。遺伝子の発現解析はABI PRISM 7700（PE Applied Biosystems社）を用いたリアルタイムPCR定量システムにより定量した。AOP-1検出用のプライマーおよびTaqManプローブはプライマーデザインソフトウェアABI PRISM Primer Expressを用いてmouse AOP-1 cDNAの塩基配列を基に設計した。フォワード プライマー 5'TGCAGTTTCAGTGGATTCCCA3'（配列番号：7）、リバーズ プライマー 5'TTCATGTGGCCCAAACCA3'（配列番号：8）、TaqManプローブ 5'TCTTGCCTGGATCAACACACCAAGAAAG3'（配列番号：9）。

【0075】

リアルタイムPCR定量反応は上記cDNA 1 μ lを鋳型として反応液40 μ lでTaqMan (登録商標) Universal PCR Mater Mix (PE Applied Biosystems社) を用いて説明書に記載の方法に従って行った。解析結果は図2に示した。その結果すべてのモデルにおいて慢性心不全病態の進行に伴いAOP-1遺伝子の発現低下が見られた。

実施例 3 : TSA(PRx2), Cu-Zn SOD, Catalase遺伝子の発現解析

実施例 1-1, Eに記載の方法にて得た左心室をサンプルとして用いた。

【0076】

総RNAは各左心室より ISOGEN (ニッポンジーン社) を用いて説明書に記載の方法に従って調製し、DNase処理を行った。DNase処理した総RNAそれぞれ1 μ gより反応液50 μ lでTaqMan (登録商標) Reverse Transcription Reagents (PE Applied Biosystems社) を用いてcDNAを合成した。遺伝子の発現解析はABI PRISM 7700 (PE Applied Biosystems社) を用いたリアルタイムPCR定量システムにより定量した。検出用のプライマーおよびTaqManプローブはプライマーデザインソフトウェアABI PRISM Primer Expressを用いてrat TSA, Cu-Zn SOD, catalase cDNAの塩基配列を基に設計した。rat TSAフォワード プライマー 5' CCCTCTGCTTGCTGATGTGACT3' (配列番号: 10)、リバーズ プライマー 5' CCTGTAAGCGATGCCCTCAT3' (配列番号: 11)、TaqManプローブ 5' AGCTTGTCCTCCAGCAATTACGGCGTGTGAA3' (配列番号: 12)。Cu-Zn SODフォワード プライマー 5' GCGGATGAAGAGAGGCATG3' (配列番号: 13)、リバーズ プライマー 5' GCCACACCGTCCTTTCCA3' (配列番号: 14)、TaqManプローブ 5' TGGAGACCTGGGCAATGTGGCTG3' (配列番号: 15)。catalaseフォワード プライマー 5' ACGGGTGCTCAGCCTCC3' (配列番号: 16)、リバーズ プライマー 5' AGGCTTGTGCCCTGCTTC3' (配列番号: 17)、TaqManプローブ 5' CAGCCTGCACTGAGGAGATCCCTCA3' (配列番号: 18)。

【0077】

リアルタイムPCR定量反応は上記cDNA 1 μ lを鋳型として反応液40 μ lでTaqMan (登録商標) Universal PCR Mater Mix (PE Applied Biosystems社製) を用い

て説明書に記載の方法に従って行った。解析結果は図3に示した。その結果sham群に対してvehicle群でAOP-1遺伝子の有意に発現低下が見られたのに対し (p=0.05)、TSA, Cu-Zn SOD, Catalaseでは遺伝子発現変化は見られなかった。

実施例 4 : ラットAOP-1 cDNAのクローニング

3-1 rat AOP-1PCR断片のクローニング

実施例 2 にて作成したcDNAを鋳型として用い、フォワード プライマー 5' AACC GCGGTCGTGGCTCTTGCGTTCTCT3' (配列番号：19)、リバープライマー 5' GCGCT AGCTTATTGATGGACCTTCTCAAAG3' (配列番号：20) を用いてPCRを行い、増幅産物をPCR IIベクター (インビトロジェン社) にTAクローニングした。

3-2 塩基配列の決定

塩基配列は、THERMO SequenaseTMII dye terminator cycle sequencing kit (アマシャムファルマシア社製) を用いて自動DNA配列読み取り装置モデル373A (Applied Biosystems社製) で解析することにより決定した。得られた遺伝子配列をGenBankのデータベースに照会した結果、クローンの1つ (pFH1) がラットAOP-1 (Genebank Accession No. AF106944: 配列番号2) と一致する遺伝子であることが判明した。

実施例 5 : rAOP-1発現アデノウイルス改変ベクターの構築

5-1. adenovirus vector AOP-1 cosmidの構築

アデノウイルス改変ベクターの構築は、宝酒造株式会社製Adenovirus Expression Vector Kitを用いて行った。実施例 3 にて構築したpFH1からAOP-1遺伝子を含むSacII, NheI断片を切り出し、pQBI25 (宝酒造株式会社製) にクローニングした。後にNheI, BamHIでGFP遺伝子を欠失させることにより、CMV promoterの下流にAOP-1遺伝子、その下流に牛Growth hormone由来のpoly Aシグナルを持ったAOP-1発現ユニットを構築した。この発現ユニットをBglIII, DraIIIを用いて切り出し、DNA Blunting Kit (宝酒造株式会社製) を用いて末端を平滑化し、Adenovirus Expression Vector Kit付属のコスミドpAxcwのSwaI siteにクローニングした。

。

5-2. 293細胞を用いたAdenovirus AOP-1発現 vectorの作製と増幅

上記のコスミドとAdenovirus Expression Vector Kit付属のDNA-TPCを293細胞 (Bio Whittaker社製) にco-transfectionした。293細胞内で、AOP-1 cosmidと、DNA-TPCが相同組換えを起こし、Adenovirus AOP-1発現 vectorが構築され、293細胞が恒常的に発現するE1蛋白の働きを借り、ウイルスとして増殖する。なお、作成したAdenovirus AOP-1発現 vectorはE1遺伝子を欠失しており、人為的にE1遺伝子を構成的に発現するよう形質転換された細胞内 (例えば293細胞) でしか増殖することが出来ない。

5-3. Adenovirus AOP-1発現 vectorのタイターチェック

実施例4-2にて構築されたAdenovirus AOP-1発現 vectorのタイターチェックは、Adenovirus Expression Vector Kit付属のマニュアル記載の方法に順じて行った。

実施例 6：ラット培養心筋細胞の作製とAOP-1遺伝子導入

生後1?3日目の新生児ラットをエーテル麻酔し、decapitation後心臓を摘出した。心室を単離し、collagenase (warthington biomedical corporation社製)消化によって細胞を分散させた。Percoll (amersham pharmacia biotech社製)を用いて密度勾配遠心を行い、心筋細胞と、非心筋細胞を分取した。牛胎仔血清(EQUITECH-BIO社製)を終濃度10%で混合した日研生物医学研究所社製D-MEM (low glucose)培地を用いて、分取した心筋細胞を培養した。実施例 5 にて作製したAdenovirus AOP-1発現 ベクターを 1.6×10^2 (M.O.I.)で1時間感染させた後、培地にて2回洗浄した。24時間培養後、実施例 7 に供した。

実施例 7：遺伝子導入細胞に対する無酸素培養、再酸素化ストレス応答解析

実施例 5 と同様の方法にて作製した β -galactosidase adenovirus vectorを用いて、実施例 6 と同様の方法にて作製した β -galactosidase強制発現細胞を作製

した。これを遺伝子導入系にて無害無益蛋白質を強制発現させたコントロール群に位置づけ、以下の実験に加えた。実施例 6 にて作製したAOP-1強制発現細胞とコントロール細胞を、無酸素培養系に24時間、その後大気酸素濃度、5 %炭酸ガス濃度での通常培養系に戻し（再酸素化）72時間培養を行った。また、同時に通常酸素濃度で、24時間培養を行った対照群も作製した。通常酸素下で培養した細胞、無酸素培養後、再酸素化培養後の細胞をそれぞれサンプリングし、顕微鏡下で観察を行った。生存する細胞数、自律に拍動する細胞数を測定し統計処理した。その後、ミトコンドリア呼吸鎖に属するsuccinate-tetrazolium reductase系が、MTT試薬（ナカライテスク社製）を還元することを利用した、細胞生存率、細胞代謝活性測定試薬を用いて解析を行った。

【 0 0 7 8 】

その結果、通常酸素濃度下で培養したAOP-1導入群、コントロール群間では、細胞生存率に差が無かったのに対して、無酸素条件下24時間培養後、再酸素化培養後の細胞生存率は、AOP-1遺伝子導入群で有意な増加を示した（図 4）。また、無酸素条件下24時間培養後、再酸素化培養後の細胞自律拍動率は、AOP-1遺伝子導入群で有意な増加を示した（図 5）。さらに、MTTを用いた実験においても、無酸素条件下24時間培養後、再酸素化培養後において、AOP-1遺伝子導入群で有意にMTT分解活性の上昇が観察された（図 6）。特に、通常酸素濃度下における培養つまり無傷害状態で細胞代謝機能を活性化したこと（図 6）より、AOP-1はミトコンドリア機能を向上させる可能性が示唆された。

【 0 0 7 9 】

一般に、酸素欠乏状態における細胞内では、好氣的エネルギー産生系から、嫌氣的エネルギー産生系への切り替えが起こり、クエン酸の蓄積等による細胞内酸性化傷害、嫌氣的エネルギー産生系が好氣的エネルギー産生系に対して非効率であるために、細胞内エネルギーの枯渇傷害が発生すると考えられている。また、再酸素化時には、ミトコンドリアにおいて活性酸素種が発生することが示されており、蛋白質、DNA、細胞膜リン脂質等の酸化を経て細胞に傷害を与える。本実施例における結果から、AOP-1は心筋細胞におけるこれらの傷害を除去し、細胞の正常な機能を維持する活性を有することが明らかとなった。

【0080】

虚血性慢性心不全（心筋梗塞後慢性心不全）のみならず慢性心不全においても、心機能の低下、心肥大に起因する、心筋細胞に対する血流不足（虚血）が報告されていることから、当該蛋白質を慢性心不全状態の心筋細胞に補充することにより、心筋細胞を保護し、さらに拍出機能を維持させることにより、慢性心不全治療薬となる。

実施例 8：anti-AOP-1発現アデノウイルス改変ベクターの構築

実施例 5 で用いたCMV promoterの下流にAOP-1遺伝子、その下流に牛Growth hormone由来のpoly Aシグナルを持ったAOP-1発現ユニットから、AOP-1遺伝子を切り出し、切り出した両方のフラグメントをDNA Blunting Kit（宝酒造株式会社製）を用いて末端を平滑化し、再びligationした。AOP-1のクローニングされた方向を配列解読によって確認した。この発現ユニットをBglIII, DraIIIを用いて切り出し、DNA Blunting Kit（宝酒造株式会社製）を用いて末端を平滑化し、Adenovirus Expression Vector Kit付属のコスミドpAxcwのSwaI siteにクローニングした。これを用い、実施例 5 と同様にウイルスベクター（adenovirus vector anti-AOP-1 cosmid）を作製した。

実施例 9：培養心筋細胞に対するAnti-AOP-1遺伝子強制発現の影響

実施例 6 と同様の方法にて、anti-AOP-1、AOP-1、 β -galactosidase強制発現細胞を作製した。未導入細胞と共に、上記遺伝子導入細胞を 72 時間培養を行った後、ミトコンドリア呼吸鎖に属するsuccinate-tetrazolium reductase系が、MTT試薬（ナカライテスク社製）を還元することを利用した、細胞生存率、細胞代謝活性測定試薬を用いて解析を行った。すると、anti-AOP-1導入細胞群でのみ有意に、MTT試薬分解物の生成が抑制されていた（図 7）。顕微鏡下で観察を行った結果、anti-AOP-1群では、有意に生存細胞数の減少が見られた。よって、Anti-AOP-1の強制発現は、培養心筋細胞の生存に不利に作用することが判明した。

実施例 10：その他病態モデルの作製

A. 腎炎モデルの作製

8週齢のWistar系雌性ラットを用いた。エーテル麻酔下で左腎臓を摘出した。その1時間後にanti-Thy-1 monoclonal antibody (1-22-3), 500 μ g/rat を静脈内投与することによって腎炎を惹起した。腎炎惹起42日後、腎臓を摘出した。

B. septic shock(感染性肝炎)モデルの作製

150-300gの同週齢ラット3匹に対し、lipopolysaccharide 10mg/kgを腹腔内投与し、2時間後肝臓を摘出した。

実施例 11：その他病態モデルでのAOP-1遺伝子の発現解析

総RNAは上記実施例10で得られた各臓器の組織よりISOGEN（ニッポンジーン社）を用いて説明書に記載の方法に従って調製し、DNase処理を行った。DNase処理した総RNAそれぞれ1 μ gより反応液50 μ lでTaqMan（登録商標）Reverse Transcription Reagents（PE Applied Biosystems社）を用いてcDNAを合成した。遺伝子の発現解析はABI PRISM 7700（PE Applied Biosystems社）を用いたリアルタイムPCR定量システムにより定量した。AOP-1遺伝子検出用のプライマーおよびTaqManプローブはプライマーデザインソフトウェアABI PRISM Primer Expressを用いてmouse AOP-1 cDNAの塩基配列を基に設計した。フォワードプライマー（配列番号：7）、リバープライマー（配列番号：8）、TaqManプローブ（配列番号：9）。

【0081】

リアルタイムPCR定量反応は上記cDNA 1 μ lを鋳型として反応液40 μ lでTaqMan（登録商標）Universal PCR Mater Mix（PE Applied Biosystems社）を用いて説明書に記載の方法に従って行った。解析結果は図8A、B及び図9に示した。その結果各疾患モデルの疾患臓器において病態の進行に伴いAOP-1遺伝子の発現低下が見られた。

実施例 12：胎仔ラット由来培養神経細胞の作製

Wistar妊娠18～20日目ラットをエーテル麻酔した後、開腹した。子宮より胎児

を取り出し、さらに胎仔から脳を取り出し氷冷HBSS（組織培養用 ハンクス液 「ニッスイ」②（日水製薬社） 9.8 g/l、NaHCO₃ 0.35 g/l を作製し濾過滅菌）中に保存した。直ちに実体顕微鏡下で大腦を分離し、蛋白質分解酵素papain（wort hington社）にて細胞を分散させた。馬血清を終濃度10%で混合した日研生物医学研究所社製D-MEM（high-glucose）培地を用いて、分取した神経細胞を培養した。培養開始後、4日目上記血清含培地を加え、さらに3日間培養を行った。合計7日間培養後、AOP-1もしくは β -galactosidaseアデノウイルスベクターによる遺伝子導入を行った。遺伝子導入後48時間培養し、Glutamate傷害、無血清化等の刺激を行った。

実施例 13：AOP-1の培養神経細胞におけるグルタミン酸傷害保護作用の検出

実施例 11にて作製した培養神経細胞に対し、実施例 6と同様の方法にてAOP-1遺伝子の導入を行った。実施例 7と同様に β -galactosidaseを強制発現させた群を比較対照に位置づけ、以下の実験に用いた。終濃度0, 100, 500 μ M、でglutamateを加え48時間培養した後、MTT assayに供した。glutamateを加えなかった、それぞれの遺伝子導入群のMTT値で、glutamate傷害群を割り返したものを神経細胞保護率としてグラフ化した（図10）。なお、図10中の、MK-801は、(+)-dibenzocyclohepteneimineであり、NMDAレセプターのアンタゴニストであり、神経培養細胞をグルタミン酸傷害から守ることが示されている（Eur J Pharmacol 1993 Dec 1;248(4):303-12）。図で示したように、AOP-1導入群はMK-801非添加群において、 β -galactosidase導入群に比較して培養神経細胞保護傾向を示した。さらに、MK-801添加群においては、 β -galactosidase導入群に比較して有意に培養神経細胞保護作用を示したので、AOP-1はMK-801の保護作用に対し相加作用を持つことが示された。神経細胞におけるグルタミン酸傷害には、前述のNMDAレセプターを介するカルシウム過負荷と、cystine, glutamate-antiporterの活性化を介する細胞内cystine枯渇傷害（Neuroscience 1992 Jun;48(4):906-914）の二つが見出されている。上記の結果から、AOP-1は上記二つの傷害に対する保護作用を併せ持つと考えられる。

実施例 1 4 : AOP-1 の培養神経細胞神経突起伸展促進作用の検出

実施例 1 2 にてグルタミン酸未添加の細胞 (10% FBS 群)、グルタミン酸添加 (10% FBS 群 + 100 μ M glutamate 群) 無血清化 (0% FBS 群)、を写真撮影した (図 1 1)。

【 0 0 8 2 】

各種刺激存在下で常に AOP-1 導入群で神経突起伸展促進、保護作用が観察された。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

各慢性心不全病態モデルラットにおける AOP-1 蛋白質の心肥大期および心不全期での発現変化を示す。

【図 2】

各慢性心不全病態モデルラットにおける AOP-1 遺伝子の心肥大期および心不全期での発現変化を示す。

【図 3】

心筋梗塞後慢性心不全モデルラットにおける AOP-1、TSA、Cu-Zn SOD および Catalase 遺伝子の発現変化を示す。

【図 4】

AOP-1 遺伝子強制発現が細胞生存率に及ぼす影響を示す。

【図 5】

AOP-1 遺伝子強制発現が細胞自立拍動率に及ぼす影響を示す。

【図 6】

AOP-1 遺伝子強制発現が MTT 分解活性に及ぼす影響を示す。

【図 7】

Anti-AOP-1 遺伝子強制発現が培養心筋細胞に及ぼす影響を示す。

【図 8】

A は、腎炎モデルにおける AOP-1 遺伝子の発現変化を病態の進行との関連で示したものであり、B は、腎炎モデルにおける TSA 遺伝子の発現変化を病態の進行

との関連で示したものである。

【図 9】

感染性肝炎モデルにおけるAOP-1遺伝子の発現変化を示す。

【図 1 0】

AOP-1遺伝子強制発現が培養神経細胞グルタミン酸傷害に及ぼす保護作用を示す。

【図 1 1】

AOP-1遺伝子強制発現が培養神経細胞に及ぼす神経突起伸展促進・保護作用を示す。

【配列表】

<110> サントリー株式会社

株式会社サントリー生物医学研究所

<120> AOP-1遺伝子又はAOP-1の発現減少を伴う疾患の治療方法及び当該疾患治療薬

<130> 010361

<160> 20

<210> 1

<211> 1542

<212> mRNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

ctgaagatgg cggctgctgt aggacggttg ctccgagcgt cggttgccccg acatgtgagt    60
gccattcctt ggggcatttc tgccactgca gccctcaggc ctgctgcatg tggaagaacg    120
agcttgacaa atttattgtg ttctgggttc agtcaagcaa aattattcag caccagttcc    180
tcatgccatg cacctgctgt caccagcat gcaccctatt ttaagggtac agccgttgctc    240
aatggagagt tcaaagacct aagccttgat gactttaagg ggaaatattt ggtgcttttc    300

```


ttctatcctt tggatttcac ctttgtgtgt cctacagaaa ttgttgcttt tagtgacaaa 360
gctaacgaat ttcacgatgt gaactgtgaa gttgtcgcag tctcagtgga ttcccacttt 420
agccatcttg cctggataaa tacaccaaga aagaatggtg gtttgggcca catgaacatc 480
gcactcttgt cagacttaac taagcagatt tcccgagact acggtgtgct gttagaaggt 540
tctggtcttg cactaagagg tctcttcata attgacccca atggagtcac caagcatttg 600
agcgtcaacg atctcccagt gggccgaagc gtggaagaaa cctccgctt ggtgaaggcg 660
ttccagtatg tagaaacaca tggagaagtc tgcccagcga actggacacc ggattctcct 720
acgatcaagc caagtcacgc tgcttccaaa gagtactttc agaaggtaaa tcagtagatc 780
acccatgtgt atctgcacct tctcaactga gagaagaacc acagttgaaa cctgctttta 840
tcattttcaa gatggttatt tgtagaaggc aaggaaccaa ttatgcttgt attcataagt 900
attactctaa atgttttgtt tttgtaattc tggctaggac cttttaaaca tggtagttg 960
ctagtacagg aatcgtttat tggtaacatc ttggtggctg gctagctagt ttctacagaa 1020
cataatttgc ctctatagaa ggctattctt agatcatgtc tcaatggaaa cactcttctt 1080
tcttagcctt acttgaatct tgcctataat aaagtagagc aacacacatt gaaagcttct 1140
gatcaacggc cctgaaattt tcatcttgaa tgtctttgta ttaaactgaa ttttctttta 1200
agctaacaaa gatcataatt ttcaatgatt agccgtgtaa ctcttgcaat gaatgtttat 1260
gtgattgaag caaatgtgaa tcgtattatt ttaaaaagtg gcagagtgac ttaactgac 1320
atgcatgac cctcatccct gaaattgagt ttatgtagtc attttactta ttttattcat 1380
tagctaactt tgtctatgta tatctctaga tattgattag tgtaatgat tataaaggat 1440
atztatcaaa tccagggtt gcattttgaa attataatta ttttctttgc tgaagtattc 1500
attgtaaaac atacaaataa catatttaaa caaaaaaaaa aa 1542

<210> 2

<211> 1433

<212> mRNA

<213> Rattus norvegicus

<400> 2

gctatcgtgg ctcttgcgtt ctctgaagat ggcggcagct gcgggaaggt tgctctggtc 60
ctcgggtggc cggcctgcga gcactatctt ccggagtatt tctgcctcaa cagttcttag 120

```

gcctgttgct tctagaagaa cctgcttgac agacatgctg tggctctgcct gtccccaagc 180 a
aagtttgcc tttagcacca gttcttcatt ccacaccct gctgtcaccc agcatgcgcc 240
ccattttaaa ggtactgctg ttgtcaatgg agagttcaaa gagctgagtc tcgacgactt 300
taaggggaaa tacttggtgc ttttcttcta ccctttggat ttcacatttg tgtgtcctac 360
agaaattggt gctttcagtg acaaagccaa tgagtttcat gacgtaaact gtgaagtagt 420
tgcggtttct gtggattccc acttcagtca tcttgccctgg atcaacacgc caagaaagaa 480
tggtggtttg ggccacatga acatcacgct gttgtcggac ttaactaagc agatatcccg 540
agactacgga gtactgttgg aaagtgctgg cattgcgctc agaggctctt tcattattga 600
ccctaattggt gtcacatcaagc acctgagtgat caatgacctt ccggtgggcc gaagtgtgga 660
agaaccactc cgtttggtaa aggcggtcca gtttgtggag acccatggag aagtctgccc 720
acccaactgg acaccagagt ccctacgat caagccaagt ccaacagctt caaaagagta 780
ctttgagaag gtccatcaat aataggctcat cctatgtctg ctggtttacc tgaagcttct 840
catgccaaaa gagagcccca gctggaatcc tgaagattat ttatagaatg gcaaaaacct 900
caccatgctt gtgtttataa gtactgctcc atgggctttg taattttaag acaggttcag 960
gttaaagggt gccagctcct tccatagctg tccttactag ggacttcttg atggctacca 1020
attctctaca agtgcttggg ccccatctt tagatcatgt cttcagaggg ttaagatttc 1080
ttagcctgcc ctgaagcttg gtctacagtg aagtagcaca tagcaccagt acttagtgaa 1140
atgaagtagc acatagcgcc agcacttagt gaaatgaagt agcatatagt gccagcactt 1200
agtgaagct tctgatcaag gtctgaaat ttcctcttgg atttttgtta attatgctga 1260
atttccatt attttttagt gtagtcatta actcacagtg tccttggttg ttctaaggta 1320
ttgatgagtt ataatcatga aggactatgt ttctaaaaca ctatgtcatt ttcttttctt 1380
caagtgctgg atgtaaagaa taaaaataaa cattaagata aaaaaaaaaa aaa 1433

```

<210> 3

<211> 1382

<212> mRNA

<213> mouse

<400> 3

```

ctactcctcg gtatctccgc ctatcgtgcc tcttgctgct tctgaagatg gcggcagctg 60

```

cggaaggtt gctctggtcc tcggttgctc gtcatacaag tgctatttcc cggagtattt 120
ctgcctcaac agttcttagg cctgttgctt ctagaagaac ctgtttgaca gacatactgt 180
ggtctgcctc tgcccaagga aagtcagcct ttagcaccag ttcctctttc cacaccctg 240
ctgtcaccca gcacgcgcc tattttaag gtactgctgt tgtcaatgga gagttcaaag 300
agctgagtct cgacgacttt aagggaat acttggtgct tttcttctac cctttggatt 360
tcacatttgt gtgtcctaca gaaattgttg ctttcagtga caaagccaat gaatttcatg 420
atgtaactg tgaagtagtt gcagtttcag tggattccca cttcagtcac cttgcctgga 480
tcaacacacc aagaaagaat ggtggtttgg gccacatgaa catcacactg ttgtcggata 540
taactaagca gatatcccg gactacggag tgctgttgga aagtgtggc attgcactca 600
gaggtctctt cattattgac cctaattggtg tcgtcaagca cctgagtgtc aacgaccttc 660
cgggtggccg cagtgtggaa gaaacactcc gtttggtaaa ggcgttccag tttgtagaga 720
cccatggaga agtctgcca gccactgga caccagagtc ccctacgac aagccaagtc 780
caacagcttc caaagagtac tttgagaagg tccatcagta ggccatccta tgtctgcaat 840
tacctgaagc ttttcaggcc aaaaaagagc cccagctgga atccttccaa tgccttgaag 900
attatttata gaatggcaaa acctcattat gtttgtgtt ataagtactg ctccacaggc 960
tttgtaattc taagacaggt tcaggctctc taaaggtggc tagctgcttc catagctgcc 1020
cttactaggg acttcttggg ggctaaccaa ttctccccga gtgctttgcc cccatttctt 1080
ggatcatgtc cttagagggt aagcattctt tcccttagcc tgccctgaac cttggtctac 1140
agtgaagtag cacatagtgc cagtacttgg tgaaatgaag tagcacatag caccagcact 1200
taatggaagc ttctgatcaa ggtcctaaaa tttctcttg aatttttgtg aattatgctg 1260
aatttccctt ttttttttt taaacagtgt cttgtgtgt tctgaggat tgaagaggta 1320
taatcatgaa ggactatgtc taatccataa gtcattttct tcaagagctg gatatataga 1380
at 1382

<210> 4

<211> 256

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Ala Ala Ala Val Gly Arg Leu Leu Arg Ala Ser Val Ala Arg His
5 10 15
Val Ser Ala Ile Pro Trp Gly Ile Ser Ala Thr Ala Ala Leu Arg Pro
20 25 30
Ala Ala Cys Gly Arg Thr Ser Leu Thr Asn Leu Leu Cys Ser Gly Ser
35 40 45
Ser Gln Ala Lys Leu Phe Ser Thr Ser Ser Ser Cys His Ala Pro Ala
50 55 60
Val Thr Gln His Ala Pro Tyr Phe Lys Gly Thr Ala Val Val Asn Gly
65 70 75 80
Glu Phe Lys Asp Leu Ser Leu Asp Asp Phe Lys Gly Lys Tyr Leu Val
85 90 95
Leu Phe Phe Tyr Pro Leu Asp Phe Thr Phe Val Cys Pro Thr Glu Ile
100 105 110
Val Ala Phe Ser Asp Lys Ala Asn Glu Phe His Asp Val Asn Cys Glu
115 120 125
Val Val Ala Val Ser Val Asp Ser His Phe Ser His Leu Ala Trp Ile
130 135 140
Asn Thr Pro Arg Lys Asn Gly Gly Leu Gly His Met Asn Ile Ala Leu
145 150 155 160
Leu Ser Asp Leu Thr Lys Gln Ile Ser Arg Asp Tyr Gly Val Leu Leu
165 170 175
Glu Gly Ser Gly Leu Ala Leu Arg Gly Leu Phe Ile Ile Asp Pro Asn
180 185 190
Gly Val Ile Lys His Leu Ser Val Asn Asp Leu Pro Val Gly Arg Ser
195 200 205
Val Glu Glu Thr Leu Arg Leu Val Lys Ala Phe Gln Tyr Val Glu Thr
210 215 220
His Gly Glu Val Cys Pro Ala Asn Trp Thr Pro Asp Ser Pro Thr Ile

225 230 235 240
Lys Pro Ser Pro Ala Ala Ser Lys Glu Tyr Phe Gln Lys Val Asn Gln
 245 250 255

<210> 5

<211> 257

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 5

Met Ala Ala Ala Ala Gly Arg Leu Leu Trp Ser Ser Val Ala Arg Pro
 5 10 15
Ala Ser Thr Ile Phe Arg Ser Ile Ser Ala Ser Thr Val Leu Arg Pro
 20 25 30
Val Ala Ser Arg Arg Thr Cys Leu Thr Asp Met Leu Trp Ser Ala Cys
 35 40 45
Pro Gln Ala Lys Phe Ala Phe Ser Thr Ser Ser Ser Phe His Thr Pro
 50 55 60
Ala Val Thr Gln His Ala Pro His Phe Lys Gly Thr Ala Val Val Asn
65 70 75 80
Gly Glu Phe Lys Glu Leu Ser Leu Asp Asp Phe Lys Gly Lys Tyr Leu
 85 90 95
Val Leu Phe Phe Tyr Pro Leu Asp Phe Thr Phe Val Cys Pro Thr Glu
 100 105 110
Ile Val Ala Phe Ser Asp Lys Ala Asn Glu Phe His Asp Val Asn Cys
 115 120 125
Glu Val Val Ala Val Ser Val Asp Ser His Phe Ser His Leu Ala Trp
130 135 140
Ile Asn Thr Pro Arg Lys Asn Gly Gly Leu Gly His Met Asn Ile Thr
145 150 155 160

Leu Leu Ser Asp Leu Thr Lys Gln Ile Ser Arg Asp Tyr Gly Val Leu
 165 170 175
 Leu Glu Ser Ala Gly Ile Ala Leu Arg Gly Leu Phe Ile Ile Asp Pro
 180 185 190
 Asn Gly Val Ile Lys His Leu Ser Val Asn Asp Leu Pro Val Gly Arg
 195 200 205
 Ser Val Glu Glu Pro Leu Arg Leu Val Lys Ala Phe Gln Phe Val Glu
 210 215 220
 Thr His Gly Glu Val Cys Pro Pro Asn Trp Thr Pro Glu Ser Pro Thr
 225 230 235 240
 Ile Lys Pro Ser Pro Thr Ala Ser Lys Glu Tyr Phe Glu Lys Val His
 245 250 255
 Gln

<210> 6

<211> 257

<212> PRT

<213> mouse

<400> 6

Met Ala Ala Ala Ala Gly Arg Leu Leu Trp Ser Ser Val Ala Arg His
 5 10 15
 Ala Ser Ala Ile Ser Arg Ser Ile Ser Ala Ser Thr Val Leu Arg Pro
 20 25 30
 Val Ala Ser Arg Arg Thr Cys Leu Thr Asp Ile Leu Trp Ser Ala Ser
 35 40 45
 Ala Gln Gly Lys Ser Ala Phe Ser Thr Ser Ser Ser Phe His Thr Pro
 50 55 60
 Ala Val Thr Gln His Ala Pro Tyr Phe Lys Gly Thr Ala Val Val Asn
 65 70 75 80

Gly Glu Phe Lys Glu Leu Ser Leu Asp Asp Phe Lys Gly Lys Tyr Leu
85 90 95
Val Leu Phe Phe Tyr Pro Leu Asp Phe Thr Phe Val Cys Pro Thr Glu
100 105 110
Ile Val Ala Phe Ser Asp Lys Ala Asn Glu Phe His Asp Val Asn Cys
115 120 125
Glu Val Val Ala Val Ser Val Asp Ser His Phe Ser His Leu Ala Trp
130 135 140
Ile Asn Thr Pro Arg Lys Asn Gly Gly Leu Gly His Met Asn Ile Thr
145 150 155 160
Leu Leu Ser Asp Ile Thr Lys Gln Ile Ser Arg Asp Tyr Gly Val Leu
165 170 175
Leu Glu Ser Ala Gly Ile Ala Leu Arg Gly Leu Phe Ile Ile Asp Pro
180 185 190
Asn Gly Val Val Lys His Leu Ser Val Asn Asp Leu Pro Val Gly Arg
195 200 205
Ser Val Glu Glu Thr Leu Arg Leu Val Lys Ala Phe Gln Phe Val Glu
210 215 220
Thr His Gly Glu Val Cys Pro Ala Asn Trp Thr Pro Glu Ser Pro Thr
225 230 235 240
Ile Lys Pro Ser Pro Thr Ala Ser Lys Glu Tyr Phe Glu Lys Val His
245 250 255
Gln

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 7

tgcagtttca gtggattccc a

<210> 8

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 8

ttcatgtggc ccaaacca

<210> 9

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 9

tcttgcctgg atcaacacac caagaaag

<210> 10

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 10

ccctctgctt gctgatgtga ct

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 11

cctgtaagcg atgccctcat

<210> 12

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 12

agcttggtccc agaattacgg cgtgttgaa

<210> 13

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 13

gcggatgaag agaggcatg

<210> 14

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 14

gccacaccgt cctttcca

<210> 15

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 15

tggagacctg ggcaatgtgg ctg

<210> 16

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 16

acgggtgctc agcctcc

<210> 17

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 17

aggcttgtgc cctgcttc

<210> 18

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 18

cagcctgcac tgaggagatc cctca

<210> 19

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 19

aaccgcggtc gtggctcttg cgttctct

<210> 20

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

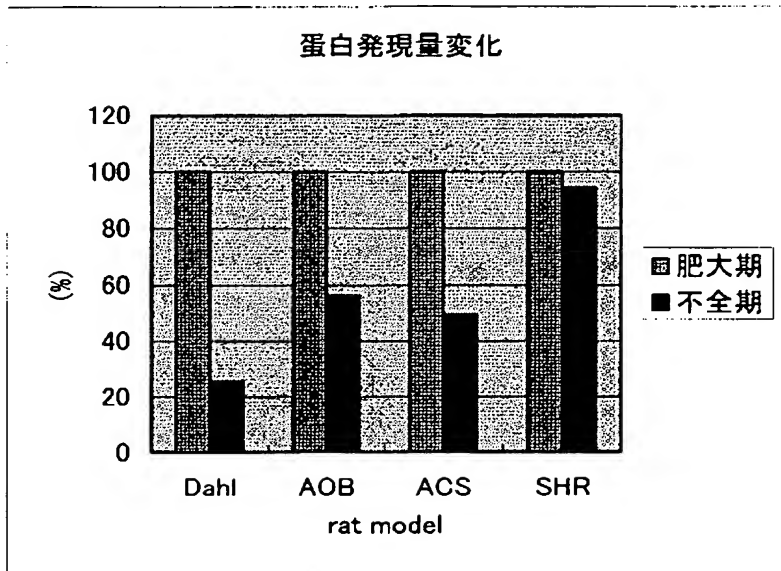
<400> 20

gcgctagctt attgatggac cttctcaaag

【書類名】 図面

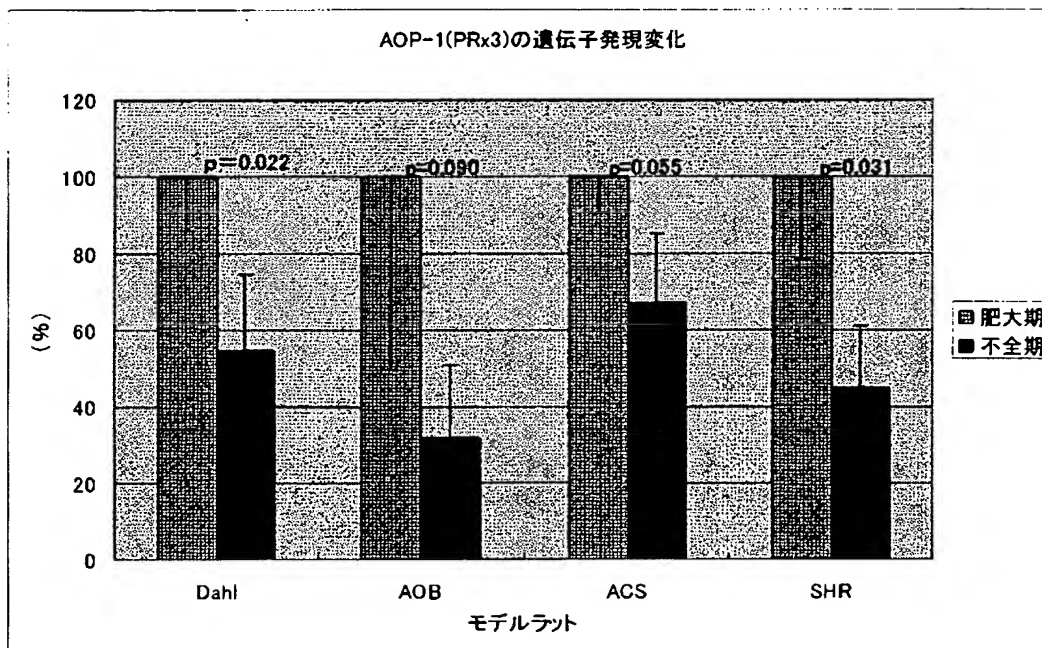
【図 1】

図1 AOP-1蛋白質の各モデルにおける発現変化



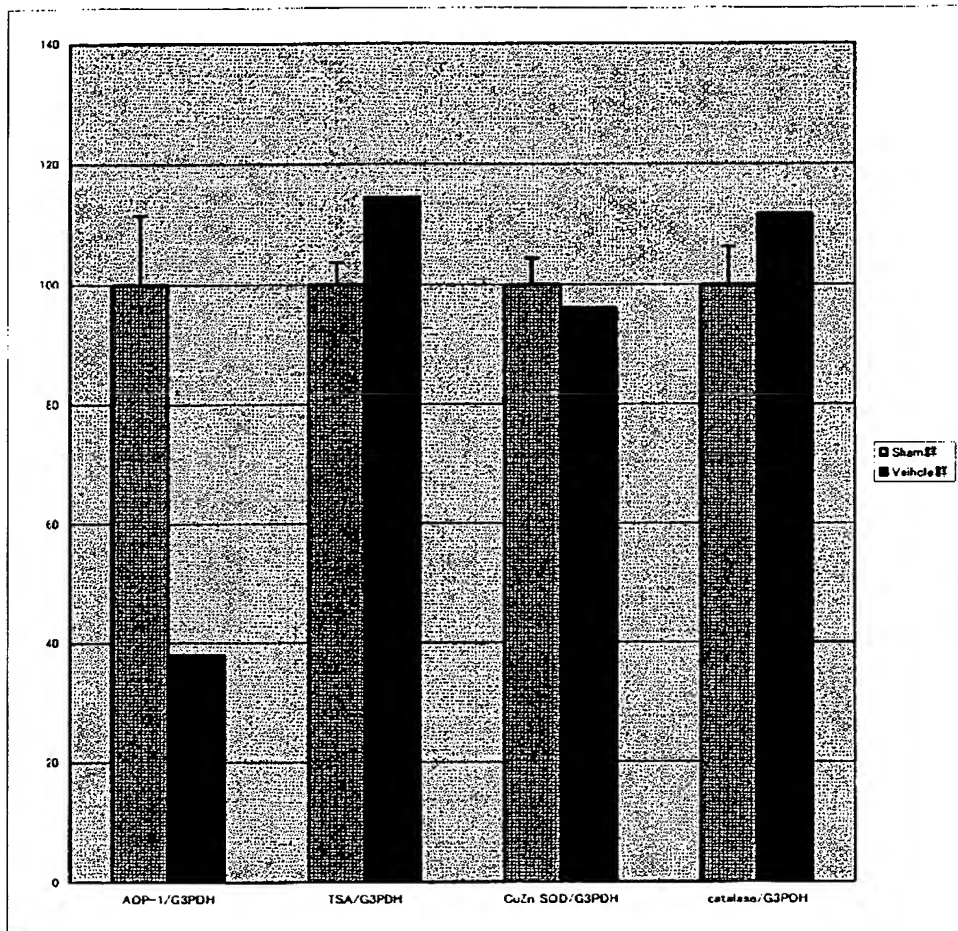
【図 2】

図2 AOP-1の各モデルラットにおける遺伝子発現変化



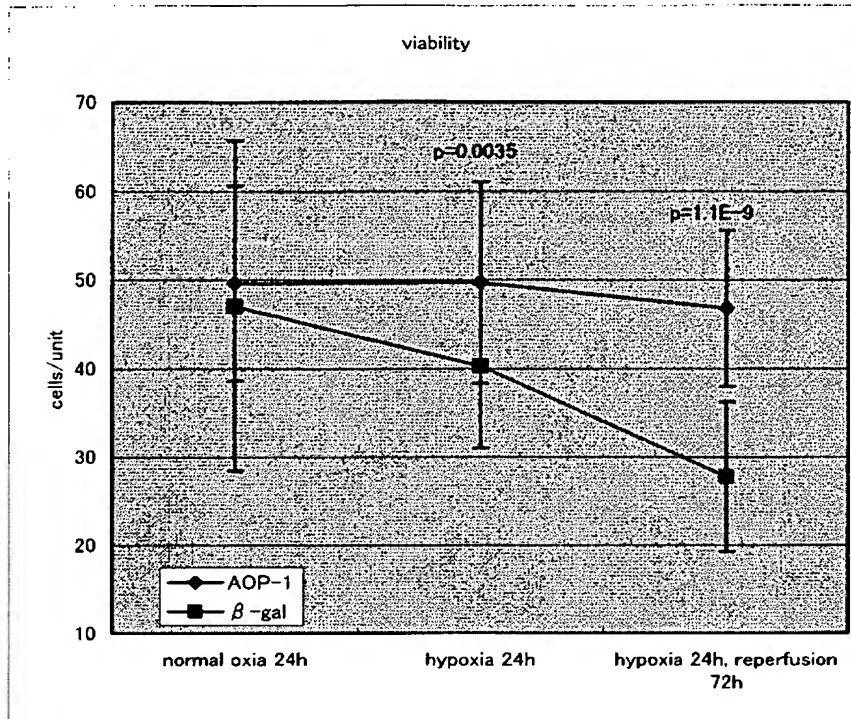
【図 3】

図3 心筋梗塞後慢性心不全モデルにおけるAOP-1, TSA, catalase, Cu-Zn SOD遺伝子発現変化解析



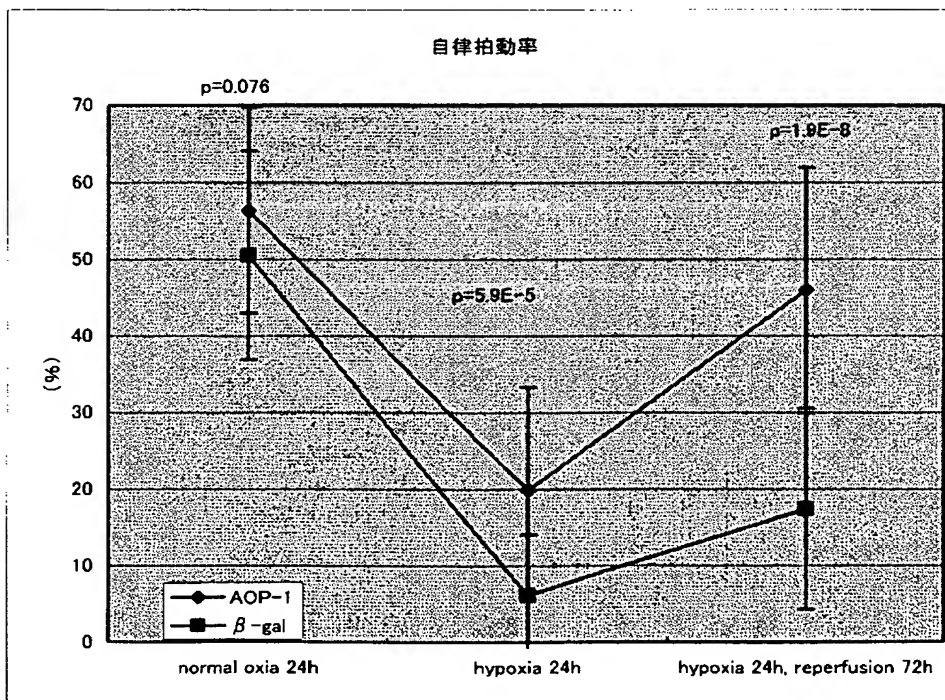
【図 4】

図4 AOP-1強発現の細胞生存率に対する作用



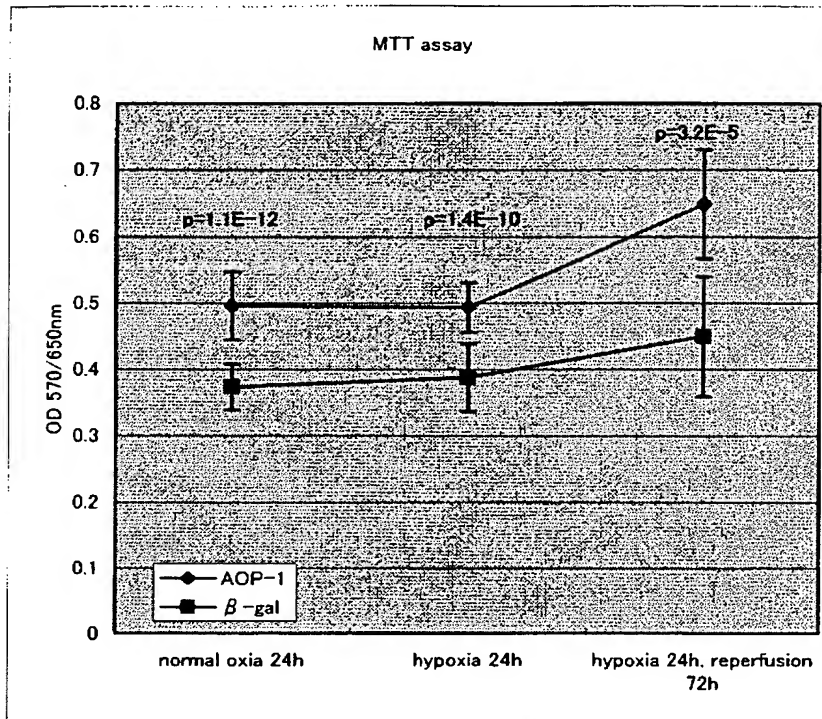
【図 5】

図5 AOP-1強発現の細胞自律拍動率に対する作用



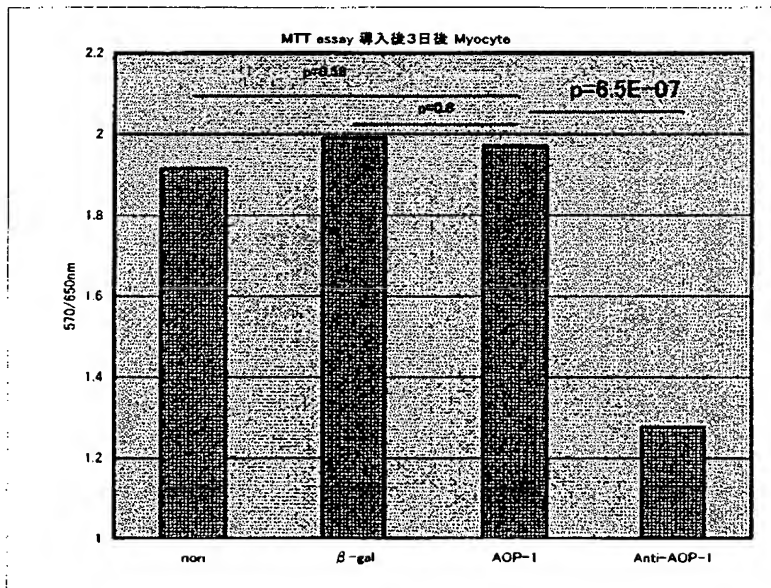
【図6】

図6 AOP-1強発現のMTT分解活性に対する作用



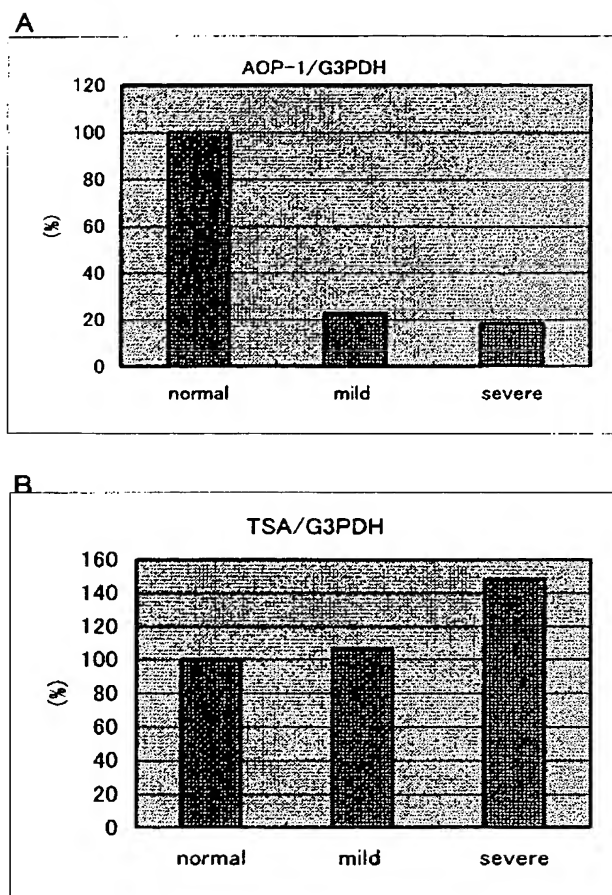
【図7】

図7 anti-AOP-1発現ベクターの培養心筋細胞に対する作用



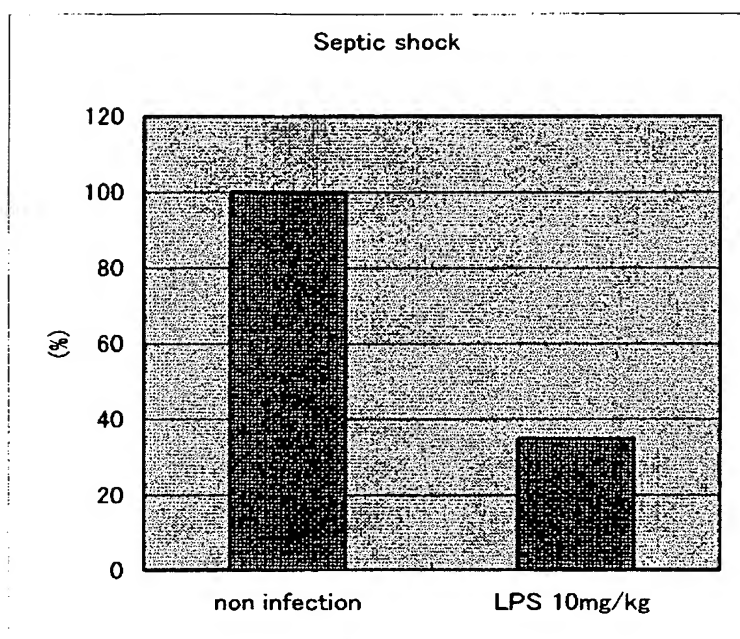
【図 8】

図8 腎炎モデルにおけるAOP-1とTSAの遺伝子発現変化



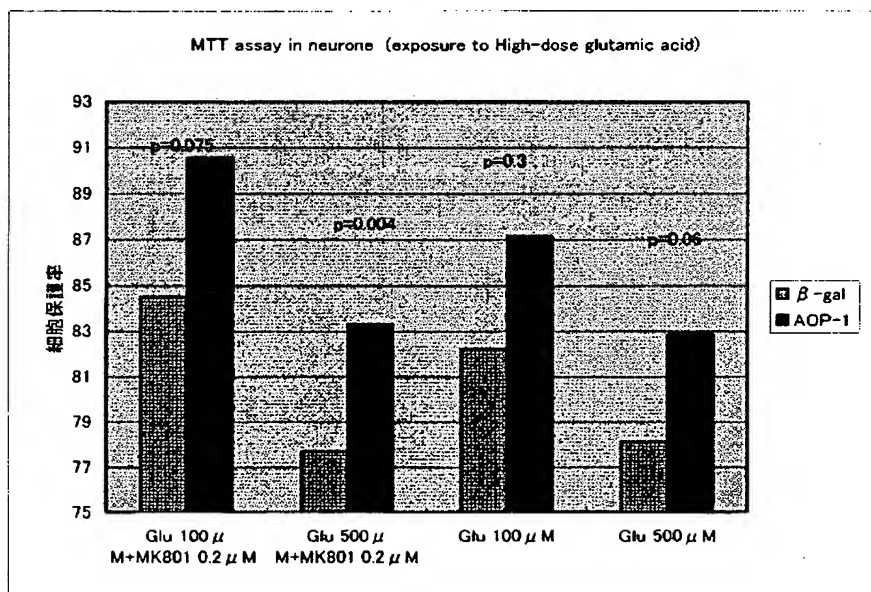
【図 9】

図 9



【図 10】

図 10、AOP-1 強発現による、培養神経細胞グルタミン酸傷害保護作用の検出



【図 11】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 AOP-1遺伝子又はAOP-1の発現減少を伴う疾患（例えば、慢性心不全、慢性関節リウマチ、神経変性疾患、腎不全等）の予防方法、治療方法又は診断方法、当該疾患の予防薬又は治療薬、当該製剤の有効成分に係る物質のスクリーニング方法、AOP-1遺伝子を発現抑制又は欠失する非ヒト形質転換動物、及び形質転換組織等を提供する。

【解決手段】 AOP-1遺伝子又はAOP-1の発現減少を伴う疾患の予防又は治療方法において、（１）AOP-1をコードする核酸、若しくはAOP-1のアミノ酸配列中のアミノ酸が１つ以上付加、欠失、置換されたAOP-1の機能を有するポリペプチドをコードする核酸を導入すること、又は（２）AOP-1遺伝子の発現を増強する物質、AOP-1の産生を増強する物質若しくはAOP-1の機能を増強する物質を投与すること、からなる当該予防又は治療方法。

職権訂正履歴（職権訂正）

特許出願の番号	特願 2 0 0 1 - 0 4 1 0 0 3
受付番号	5 0 1 0 0 2 2 1 2 7 2
書類名	特許願
担当官	佐々木 吉正 2 4 2 4
作成日	平成 1 3 年 2 月 2 2 日

<訂正内容 1 >

訂正ドキュメント

図面

訂正原因

職権による訂正

訂正メモ

図面中【図 1 2】は存在しないので、【図 1 2】を削除しました。

訂正前内容

【図 1 2】

訂正後内容

削除

次頁無

特願 2 0 0 1 - 0 4 1 0 0 3

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[0 0 0 0 0 1 9 0 4]

1. 変更年月日
[変更理由]

1 9 9 0 年 8 月 1 3 日
新規登録

住 所
氏 名

大阪府大阪市北区堂島浜 2 丁目 1 番 4 0 号
サントリー株式会社

特願 2 0 0 1 - 0 4 1 0 0 3

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[5 0 0 4 2 2 1 8 2]

1. 変更年月日 2 0 0 0 年 9 月 8 日
 [変更理由] 新規登録
 住 所 大阪府三島郡島本町若山台1丁目1番1号
 氏 名 株式会社サントリー生物医学研究所

2. 変更年月日 2 0 0 3 年 3 月 1 7 日
 [変更理由] 名称変更
 住 所 大阪府三島郡島本町若山台1丁目1番1号
 氏 名 株式会社第一サントリー生物医学研究所